Käesolev tekst on üksnes dokumenteerimisvahend ning sel ei ole mingit õiguslikku mõju. Liidu institutsioonid ei vastuta selle teksti sisu eest. Asjakohaste õigusaktide autentsed versioonid, sealhulgas nende preambulid, on avaldatud Euroopa Liidu Teatajas ning on kättesaadavad EUR-Lexi veebisaidil. Need ametlikud tekstid on vahetult kättesaadavad käesolevasse dokumenti lisatud linkide kaudu

►B

KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 440/2008,

30. mai 2008,

millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)

(EMPs kohaldatav tekst)

(ELT L 142, 31.5.2008, lk 1)

Muudetud:

		Euroopa Liidu Teataja		
		nr	lehekülg	kuupäev
►M1	Komisjoni määrus (EÜ) nr 761/2009, 23. juuli 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Komisjoni määrus (EL) nr 1152/2010, 8. detsember 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Komisjoni määrus (EL) nr 640/2012, 6. juuli 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Komisjoni määrus (EL) nr 260/2014, 24. jaanuar 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Komisjoni määrus (EL) nr 900/2014, 15. juuli 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Komisjoni määrus (EL) 2016/266, 7. detsember 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Komisjoni määrus (EL) 2017/735, 14. veebruar 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Komisjoni määrus (EL) 2019/1390, 31. juuli 2019	L 247	1	26.9.2019

▼B

KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 440/2008,

30. mai 2008,

millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)

(EMPs kohaldatav tekst)

Artikkel 1

Määruse (EÜ) nr 1907/2006 rakendamisel kasutatavad katsemeetodid on esitatud käesoleva määruse lisas.

Artikkel 2

Komisjon vaatab käesolevas määruses esitatud katsemeetodeid vajaduse korral läbi, et asendada, vähendada ja täiustada selgroogsetega tehtavaid katseid.

Artikkel 3

Viiteid direktiivi 67/548/EMÜ V lisale tõlgendatakse viidetena käesolevale määrusele.

Artikkel 4

Käesolev määrus jõustub järgmisel päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolevat määrust kohaldatakse alates 1. juunist 2008.

▼B

LISA

▼M6

Märkus

Kui ükskõik millise allpool kirjeldatud katsemeetodi puhul ei ole määratletud selle sobivust segude, mitut koostisosa sisaldavate ainete (*multi-constituent substance*, MCS) või tundmatu või muutuva koostisega ainete, komplekssete reaktsioonisaaduste või bioloogilist päritolu materjalide (UVCB) analüüsimiseks, tuleb enne meetodi kasutamist segu, mitut koostisosa sisaldava aine või UVCB analüüsimiseks kaaluda, kas asjaomane meetod on taotletavat regulatiivset eesmärki silmas pidades sobiv.

Kui asjaomast katsemeetodit kasutatakse segu, mitut koostisosa sisaldava aine või UVCB analüüsimiseks, tuleks teha kättesaadavaks piisav ja võimalikult ammendav teave sellise segu või aine koostise kohta, nt selle koostisosade keemilise määratluse, kvantitatiivse sisalduse ja asjakohaste omaduste kohta.

▼B

A OSA: FÜÜSIKALIS-KEEMILISTE OMADUSTE MÄÄRAMISE MEETODID

SISUKORD

A.1. SULAMIS-/KÜLMUMISTEMPERATUUR

A.2. KEEMISTEMPERATUUR

A.3. SUHTELINE TIHEDUS

A.4. AURURÕHK

A.5. PINDPINEVUS

A.6. LAHUSTUVUS VEES

A.8. JAOTUSTEGUR

A.9. LEEKPUNKT

A.10. SÜTTIVUS (TAHKED AINED)

A.11. SÜTTIVUS (GAASID)

A.12. SÜTTIVUS (KOKKUPUUTEL VEEGA)

A.13. TAHKETE AINETE JA VEDELIKE ISESÜTTIVUS

A.14. PLAHVATUSOHTLIKKUS

A.15. ISESÜTTIMISTEMPERATUUR (VEDELIKUD JA GAASID)

A.16. TAHKETE AINETE SUHTELINE ISESÜTTIMISTEMPERATUUR

A.17. OKSÜDEERIVAD OMADUSED (TAHKED AINED)

A.18. POLÜMEERIDE ARVKESKMINE MOLEKULMASS JA MOLEKULMASSIDE JAOTUS

A.19. MADALAMOLEKULAARSETE AINETE SISALDUS POLÜMEERIS

A.20. POLÜMEERIDE LAHUSTUMIS-/EKSTRAHEERUMISKÄITUMINE VEES

A.21. OKSÜDEERIMISVÕIME (VEDELIKUD)

A.22. KIUDUDE PIKKUSE JÄRGI KAALUTUD GEOMEETRILINE KESKMINE DIAMEETER

A.23. JAOTUSKOEFITSIENT (SÜSTEEMIS 1-OKTANOOL-VESI): AEGLASE SEGAMISE MEETOD

A.24. JAOTUSKOEFITSIENT (*N*-OKTANOOL/VESI): KÕRGEFEKTIIVSE VEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) MEETOD

A.25. DISSOTSIATSIOONIKONSTANDID VEES (TIITRIMISMEETOD, SPEKTROFOTOMEETRILINE MEETOD, KONDUKTOMEETRILINE MEETOD)

▼B

A.1. **SULAMIS-/KÜLMUMISTEMPERATUUR**

1. **MEETOD**

Enamik kirjeldatud meetoditest põhineb OECD katsesuunisel (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viidetes 2 ja 3.

1.1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatud meetodid ja seadmed on ette nähtud ainete sulamistemperatuuri määramiseks olenemata nende puhtusastmest.

Meetodi valik sõltub analüüsitava aine iseloomust. Määravaks teguriks on see, kas aine on kergesti või raskesti või üldse mitte peenestatav.

Mõnede ainete puhul on kohasem määrata külmumis- või tahkumistemperatuur ning meetod sisaldab ka nende määramise standardeid.

Kui aine teatavate omaduste tõttu ei ole otstarbekohane määrata ühtki eespool toodud parameetrit, võib otstarbekas olla määrata hangumistemperatuur.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Sulamistemperatuuri defineeritakse temperatuurina, mille juures aine läheb tahkest olekust vedelasse, ja ideaalis vastab see temperatuur külmumistemperatuurile.

Kuna paljude ainete puhul toimub faasisiire mingis temperatuurivahemikus, nimetatakse seda sageli sulamisvahemikuks.

Ühikute teisendamine (K ^{o}C-ks)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatuur Celsiuse skaalal, Celsiuse kraadides (^{o}C)

T: termodünaamiline temperatuur, kelvinites (K)

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Mõned kaliibrimisained on loetletud viites 4.

▼B

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Määratakse temperatuur (temperatuurivahemik), mille juures toimub faasisiire tahkest olekust vedelasse või vedelast olekust tahkesse. Praktikas määratakse testaine proovi atmosfäärirõhul kuumutamisel/-jahutamisel sulamise/külmumise alg- ja lõppfaasi temperatuurid. Kirjeldatud viit tüüpi meetodeid, nimelt kapillaartorumeetodit, kuumlaua meetodeid, külmumistemperatuuri määramisi, termoanalüüsimeetodeid ja (naftaõlide jaoks välja töötatud) hangumistemperatuuri määramist.

Teatud juhtudel võib olla otstarbekas määrata külmumistemperatuuri asemel sulamistemperatuur.

1.4.1. **Kapillaartorumeetod**

1.4.1.1. *Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Väike kogus peenestatud ainet viiakse kapillaartorusse ja surutakse tihedalt kokku. Kapillaartoru kuumutatakse koos termomeetriga, reguleerides temperatuuri tõusu nii, et tegeliku sulamisprotsessi ajal tõuseb temperatuur kiirusega umbes alla 1 K/min. Määratakse sulamise alg- ja lõpptemperatuur.

1.4.1.2. *Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Põhimõttelt analoogsed punktis 1.4.1.1 kirjeldatuga, kuid kapillaartoru ja termomeeter asuvad kuumutatavas metallplokis ning on vaadeldavad plokis olevate vaatlusavade kaudu.

1.4.1.3. *Määramine fotoraku abil*

Kapillaartorus asuvat proovi kuumutatakse automaatrežiimil metallsilindris. Silindris oleva ava kaudu juhitakse läbi aine täppiskaliibritud fotorakule suunatud valguskiir. Enamiku ainete optilised omadused muutuvad sulades läbipaistmatust läbipaistvaks. Fotorakuni jõudva valguse intensiivsus suureneb ja saadab kuumkambris asuva plaatina-takistustermomeetri temperatuuri digitaalnäidikule stoppsignaali. Mõnede tugeva värvusega ainete jaoks see meetod ei sobi.

1.4.2. **Kuumlauad**

1.4.2.1 *Kofleri sulavuslaud*

Kofleri sulavuslaud koosneb kahest erineva soojusjuhtivusega elektriliselt kuumutatavast metallosast, kusjuures laud on valmistatud selliselt, et temperatuurigradient on kogu selle pikkuses peaaegu lineaarne. Sulavuslaua temperatuur võib varieeruda piirides 283–573 K ning sellel on spetsiaalne temperatuurinäidik antud lauale kohandatud skaala, osuti ja jooksikuga. Sulamistemperatuuri määramiseks kantakse aine õhukese kihina otse sulavuslaua pinnale. Mõne sekundi jooksul kujuneb välja terav eraldusjoon vedela ja tahke faasi vahel. Temperatuuri eraldusjoonel loetakse osuti viimisega eraldusjoonele.

▼B

1.4.2.2. *Sulavusmikroskoop*

Väga väikeste materjalikoguste sulamistemperatuuri määramisel kasutatakse mitmesuguste kuumlaudadega mikroskoope. Enamiku kuumlaudade puhul mõõdetakse temperatuuri tundliku termopaari abil, vahel kasutatakse aga elavhõbetermomeetrit. Tüüpilises sulavusmikroskoobi kuumlauas on kuumkamber, milles olevale metallalusele asetatakse objektiklaasil olev proov. Metallaluse keskel on ava, mille kaudu siseneb mikroskoobi valguspeeglist lähtuv valgus. Kasutamise ajal suletakse kamber klaasplaadiga, mis takistab õhu juurdepääsu proovile.

Proovi kuumutamist reguleeritakse reostaadiga. Väga täpseteks mõõtmisteks optiliselt anisotroopsete ainetega võib kasutada polariseeritud valgust.

1.4.2.3. *Meniskimeetod*

Seda meetodit kasutatakse eelkõige polüamiidide puhul.

Temperatuur, mille juures kuumlaua ja polüamiid-katseobjektile toetuva katteklaasi vahele paigutatud silikoonõli menisk nihkub, määratakse visuaalselt.

1.4.3. **Külmumistemperatuuri määramise meetod**

Proov asetatakse spetsiaalsesse katseklaasi ja paigutatakse külmumistemperatuuri määramiseks seadmesse. Jahutamise ajal segatakse proovi pidevalt kergelt ja mõõdetakse sobivate vaheaegade tagant temperatuuri. Niipea, kui temperatuur paari mõõtmise kestel püsima jääb, registreeritakse see temperatuur külmumistemperatuurina (arvestades ka termomeetri viga).

Vältida tuleb allajahutamist, säilitades tahke ja vedela faasi vahel tasakaalu.

1.4.4. **Termoanalüüs**

1.4.4.1 *Diferentsiaaltermoanalüüs (DTA)*

Registreeritakse ühele ja samale juhitavale temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride erinevuse sõltuvus temperatuurist. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (sulamine) või eksotermilise (külmumine) kõrvalekaldena temperatuurikõvera nulljoonest.

▼B

1.4.4.2 *Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria (SDK)*

Registreeritakse neelduva energia koguse sõltuvus temperatuurist ühele ja samale juhitavale temperatuuriprogrammile allutatud uuritavas aines ja võrdlusmaterjalis. Neelduv energia kulutatakse uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride ühtlustamisele. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (sulamine) või eksotermilise (külmumine) kõrvalekaldena soojusbilansi kõvera nulljoonest.

1.4.5. **Hangumistemperatuur**

Meetod on välja töötatud naftaõlide jaoks ja sobib kasutamiseks madala sulamistemperatuuriga õlitaoliste ainete puhul.

Pärast algset kuumutamist jahutatakse proovi kindla kiirusega ja jälgitakse iga 3 K tagant selle voolavust. Madalaim temperatuur, mille juures aine liikumist täheldatakse, registreeritakse hangumistemperatuurina.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Erinevate sulamistemperatuuri/sulamisvahemiku määramise meetodite kohaldatavust ja täpsust kirjeldatakse järgmises tabelis.

TABEL: MEETODITE KOHALDATAVUS

A. **Kapillaartorumeetodid**

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus ([1])	Olemasolev standard
Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks	jah	Ainult mõnede puhul	273–573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks	jah	Ainult mõnede puhul	293 kuni > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Määramine fotoraku abil	jah	Lisaseadmete abil paljude puhul	253–573 K	± 0,5 K	

([1]) Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

▼B

B. **Kuumlauad ja külmutamismeetodid**

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus (1)	Olemasolev standard
Kofleri sulavuslaud	jah	ei	283 kuni > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Sulavusmikroskoop	jah	Ainult mõnede puhul	273 kuni > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskimeetod	ei	Eelkõige polüamiidide puhul	293 kuni > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Külmumistemperatuuri meetodid	jah	jah	223–573 K	± 0,5 K	nt BS 4695

(1) Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

C. **Termoanalüüs**

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus (1)	Olemasolev standard
Diferentsiaaltermoanalüüs	jah	jah	173 – 1 273 K	kuni 600 K ± 0,5 K kuni 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria	jah	jah	173 – 1 273 K	kuni 600 K ± 0,5 K kuni 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

D. **Hangumistemperatuur**

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus (1)	Olemasolev standard
Hangumistemperatuur	Naftaõlide ja õlitaoliste ainete jaoks	Naftaõlide ja õlitaoliste ainete jaoks	223–323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

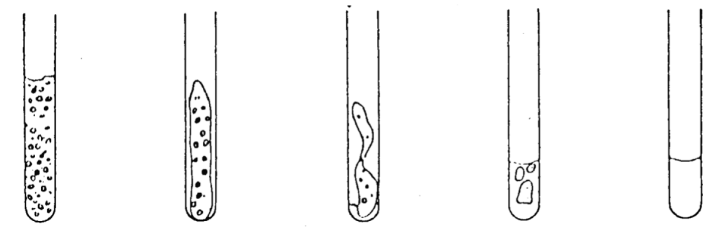
Peaaegu kõigi katsemeetodite kirjeldus on ära toodud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites (vt liidet 1).

1.6.1. **Kapillaartorumeetodid**

Temperatuuri aeglasel tõstmisel ilmnevad peenestatud ainete puhul tavaliselt joonisel 1 näidatud sulamisetapid.

▼B

Joonis 1



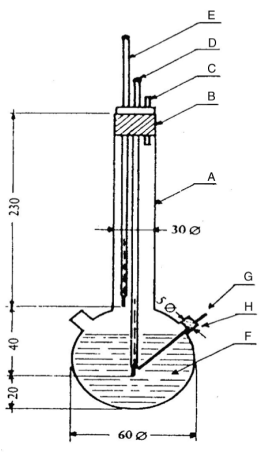
A-etapp	Sulamise algus: peened tilgakesed kinnituvad ühtlaselt kapillaartoru siseseinale.
B-etapp	Kokkutõmbumine: proov eemaldub sulava massi kokkutõmbumise tõttu siseseinast.
C-etapp	Kokkutõmbunud proov vajub kokku ja vedeldub.
D-etapp	Vedeliku pinnal kujuneb välja täielik menisk, kuid arvestatav osa proovist jääb veel tahkeks.
E-etapp	Sulamise lõppfaas: tahkeid osakesi enam pole.

Sulamistemperatuuri määramisel registreeritakse temperatuur nii sulamise alg- kui ka lõppfaasis.

1.6.1.1. *Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Joonisel 2 on näidatud standarditud klaasist sulamistemperatuuri määramise seadet (JIS K 0064); kõik mõõdud on millimeetrites.

Joonis 2



A: Mõõtmisnõu
B: Kork
C: Õhuava
D: Termomeeter
E: Lisatermomeeter
F: Vannivedelik
G: Klaasist kapillaartoru pikkusega 80 – 100 mm, sisediameetriga 1,0 ± 0,2 mm ja seinapaksusega 0,2 – 0,3 mm
H: Külgtoru

▼B

Vedelikuvannis kuumutamisel kasutatav vedelik

Valida tuleks sobiv vedelik. Vedeliku valik sõltub määratavast sulamistemperatuurist, nt sobib parafiinõli sulamistemperatuuridele kuni 473 K, silikoonõli sulamistemperatuuridele kuni 573 K.

523 K ületavate sulamistemperatuuride puhul võib kasutada segu kolmest osast väävelhappest ja kahest osast (massisuhtes) kaaliumsulfaadist. Seesuguste segude kasutamisel tuleb rakendada kohaseid ettevaatusabinõusid.

Termomeeter

Kasutada tuleks ainult järgmiste või nendega võrdväärsete standardite nõuetele vastavaid termomeetreid:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Katse käik

Kuiv aine peenestatakse uhmris ja viiakse ühest otsast kinnisesse kapillaartorusse nii, et pärast kokkusurumist täidab aine kapillaartoru 3 mm ulatuses. Ühtlaselt tihendatud proovi saamiseks tuleks kapillaartorul lasta klaastorus umbes 700 mm kõrguselt vertikaalselt vastu kellaklaasi kukkuda.

Täidetud kapillaartoru paigutatakse vanni nii, et termomeetri elavhõbedareservuaari keskosa puutub kapillaartoruga kokku kohas, kus asub proov. Tavaliselt asetatakse kapillaartoru seadmesse temperatuuril umbes 10 K alla sulamistemperatuuri.

Vannivedelikku soojendatakse nii, et temperatuur tõuseb umbes 3 K/min. Soovitatav on vedelikku segada. Umbes 10 K enne eeldatava sulamistemperatuurini jõudmist vähendatakse temperatuuri tõusu kiiruseni mitte üle 1 K/min.

Arvutamine

Sulamistemperatuur arvutatakse järgmiselt:

$$T = T_D + 0{,}00016(T_D - T_E)\ n$$

kus:

T = parandatud sulamistemperatuur (K)

T_D = termomeetri D temperatuurinäit (K)

T_E = termomeetri E temperatuurinäit (K)

n = skaalajaotuste arv termomeetri D elavhõbedasamba väljaulatuval osal

1.6.1.2. *Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Seade

Koosneb:

— silindrilisest metallplokist, mille ülaosa on õõnes ja moodustab kambri (vt joonist 3);

— metallkorgist ühe või kahe avaga, mis võimaldavad metallplokki torusid paigaldada;

▼B

— metallploki kütteseadmest, mis võib olla lahendatud näiteks elektritakistusena plokis;

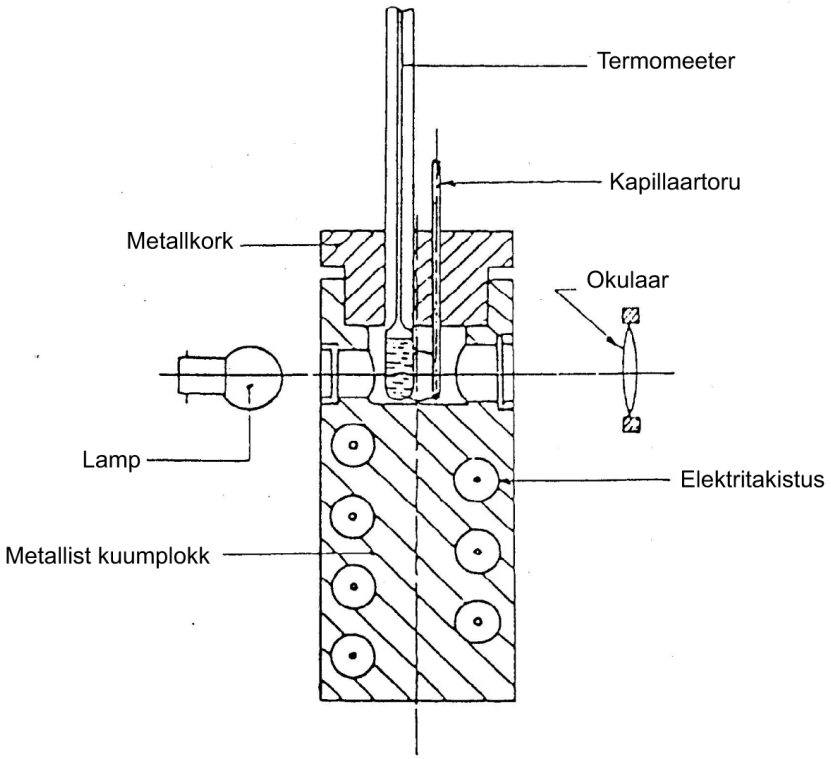
— reostaadist võimsuse reguleerimiseks juhul, kui kasutatakse elektrilist kütteseadet;

— neljast üksteise suhtes täisnurga all paiknevast kuumuskindla klaasiga aknast kambri külgseintel. Ühe sellise akna ette on paigaldatud okulaar kapillaartoru jälgimiseks. Kolme ülejäänud akent kasutatakse sisemuse valgustamiseks lampide abil;

— ühest otsast kinnisest kuumuskindlast klaasist kapillaartorust (vt 1.6.1.1).

Vt punktis 1.6.1.1 nimetatud standardeid. Sobivad ka võrreldava täpsusega termoelektrilised mõõteseadmed.

Joonis 3



1.6.1.3. *Määramine fotoraku abil*

Seade ja katse käik

Seade koosneb automaatse küttesüsteemiga metallkambrist. Kolm kapillaartoru täidetakse vastavalt punktile 1.6.1.1 ja paigutatakse ahju.

▼B

Seadme kaliibrimiseks on võimalik kasutada mitmesuguseid lineaarseid temperatuuritõuse; sobivat temperatuuritõusu reguleeritakse elektriliselt vastavalt seadistatud konstantsele lineaarsele tõusukiirusele. Meerikud näitavad ahju tegelikku temperatuuri ja kapillaartorus oleva aine temperatuuri.

1.6.2. **Kuumlauad**

1.6.2.1. *Kofleri sulavuslaud*

Vt liidet.

1.6.2.2. *Sulavusmikroskoop*

Vt liidet.

1.6.2.3. *Meniskimeetod (polüamiididele)*

Vt liidet.

Sulamistemperatuuri vahemikus ei tohiks temperatuur tõusta kiiremini kui 1 K/min.

1.6.3. **Külmumistemperatuuri määramise meetodid**

Vt liidet.

1.6.4. **Termoanalüüs**

1.6.4.1. *Diferentsiaaltermoanalüüs*

Vt liidet.

1.6.4.2. *Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria*

Vt liidet.

1.6.5. **Hangumistemperatuuri määramine**

Vt liidet.

2. **ANDMED**

Mõningatel juhtudel on termomeetri näitusid vaja korrigeerida.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— kasutatud meetodit;

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetapi kirjeldust (kui seda on rakendatud);

— hinnangulist täpsust.

Sulamistemperatuurina registreeritakse vähemalt kahe hinnangulise täpsuse piiridesse (vt tabeleid) jääva mõõtetulemuse keskmine.

▼B

Kui sulamise alg- ja lõppfaasi temperatuuride vahe jääb meetodi hinnangulise täpsuse piiridesse, registreeritakse sulamistemperatuurina sulamise lõppfaasi temperatuur; vastasel juhul registreeritakse mõlemad väärtused.

Kui aine enne sulamistemperatuurini jõudmist laguneb või sublimeerub, registreeritakse temperatuur, mille juures see aset leiab.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

4. **VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.

3. R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

4. IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

▼B

Liide

Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega.

1. **Kapillaartoru meetodid**

1.1. Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point”

2. **Kuumlauad**

2.1. Kofleri sulavuslaud

ANSI/ASTM D 3451	76 Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2. Sulavusmikroskoop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniskimeetod (polüamiididele)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point”

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Determination du „point de fusion” Methode du ménisque

3. **Külmumistemperatuuri määramise meetodid**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termoanalüüs**

4.1. Diferentsiaaltermoanalüüs

ASTM E 537-76	Standard method for asseying the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermisches Analyse, Begriffe

4.2. Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria

ASTM E 537-76	Standard method for asseying the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermisches Analyse, Begriffe

5. **Hangumistemperatuuri määramine**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point.

▼B

A.2. KEEMISTEMPERATUUR

1. MEETOD

Enamik kirjeldatud meetoditest põhineb OECD katsesuunisel (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viidetes 2 ja 3.

1.1. SISSEJUHATUS

Siin kirjeldatud meetodeid ja seadmeid saab kasutada vedelate ja madala sulamistemperatuuriga ainete korral eeldusel, et nendega ei toimu allpool keemistemperatuuri mingeid keemilisi reaktsioone (näiteks autooksüdatsiooni, ümberasetust, lagunemist jne). Meetodid sobivad kohaldamiseks nii puhastele kui ka lisanditega vedelikele.

Põhirõhk on pandud fotorakk-detektorit või termoanalüüsi kasutavatele meetoditele, kuna need sobivad nii sulamis- kui ka keemistemperatuuri määramiseks. Lisaks on mõõtmised automatiseeritavad.

„Dünaamilise meetodi" eelis on sobivus ka aururõhu määramiseks ning puudub vajadus parandada keemistemperatuuri normaalrõhule (101,325 kPa), kuna rõhku on mõõtmise käigus võimalik manostaadi abil normaalrõhule reguleerida.

Märkused

Lisandite mõju keemistemperatuuri määramisele sõltub olulisel määral lisandi iseloomust. Kui proov sisaldab tulemust mõjutada võivaid lenduvaid lisandeid, võib seda puhastada.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Keemistemperatuur normaalrõhul defineeritakse temperatuurina, mille juures vedeliku aururõhk on 101,325 kPa.

Kui keemistemperatuuri ei määrata normaalrõhul, kirjeldab aururõhu sõltuvust temperatuurist Clausiuse-Clapeyroni võrrand:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + const.$$

kus:

P = aine aururõhk paskalites

ΔH_V = aine aurustumissoojus (J mol^{-1})

R = universaalne gaasikonstant = 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = termodünaamiline temperatuur (K)

Keemistemperatuur registreeritakse mõõtmisaegse õhurõhu suhtes.

▼B

Teisendused

Rõhk (ühikud: kPa)

100 kPa = 1bar = 0,1 MPa

(ühik „bar” on lubatud, kuid ei ole soovitatav)

133 Pa = 1mm Hg=1 Torr

(ühikud „mm Hg” ja „Torr” ei ole lubatud)

1 atm = normaalatmosfäär = 101 325 Pa

(ühik „atm” ei ole lubatud)

Temperatuur (ühikud: K)

t = T - 273,15

t: temperatuur Celsiuse skaalal, Celsiuse kraadides (^{o}C)

T: termodünaamiline temperatuur, kelvinites (K)

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Mõned kaliibrimisained on ära toodud liites loetletud meetodites.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Viis meetodit keemistemperatuuri (keemistemperatuuri vahemiku) määramiseks põhinevad keemistemperatuuri mõõtmisel, ülejäänud kaks termoanalüüsil.

1.4.1. **Määramine ebulliomeetri abil**

Ebulliomeetrid töötati algselt välja molaarmassi määramiseks keemistemperatuuri tõusu järgi, kuid nad sobivad ka keemistemperatuuri täpseks mõõtmiseks. Väga lihtsat seadet kirjeldatakse ASTM D 1120-72 (vt liidet). Selles seadmes kuumutatakse vedelikku atmosfäärirõhul tasakaalutingimustes kuni keemiseni.

1.4.2. **Dünaamiline meetod**

Selle meetodi kohaselt mõõdetakse keemise ajal tagasijooksus sobiva termomeetri abil auru kondensatsioonitemperatuur. Meetod võimaldab rõhku varieerida.

1.4.3. **Destillatsioonimeetod keemistemperatuuri määramiseks**

Selle meetodi kohaselt mõõdetakse vedeliku destillatsioonil auru kondensatsioonitemperatuur ja destillaadi kogus.

▼B

1.4.4. **Siwoloboffi meetod**

Proovi kuumutatakse katseklaasis vedelikuvannil. Katseklaasi paigutatakse alt kinni joodetud kapillaartoru, mille alumises osas on õhumull.

1.4.5. **Määramine fotoraku abil**

Mõõtmine tehakse eralduvate mullide põhjal automaatselt ja fotoelektriliselt, järgides Siwoloboffi meetodit.

1.4.6. **Diferentsiaaltermoanalüüs**

Registreeritakse ühele ja samale juhitavale temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride erinevuse sõltuvus temperatuurist. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (keemine) kõrvalekaldena temperatuurikõvera nulljoonest.

1.4.7. **Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria**

Registreeritakse neelduva energia koguse sõltuvus temperatuurist ühele ja samale juhitavale temperatuuriprogrammile allutatud uuritavas aines ja võrdlusmaterjalis. Neelduv energia kulutatakse uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride ühtlustamisele. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (keemine) kõrvalekaldena soojusbilansi kõvera nulljoonest.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Erinevate keemistemperatuuri/keemistemperatuuri vahemiku määramise meetodite kohaldatavust ja täpsust kirjeldatakse tabelis 1.

Tabel 1.

Meetodite võrdlus

Mõõtmismeetod	Hinnanguline täpsus	Olemasolev standard
Ebulliomeeter	± 1,4 K (kuni 373 K) (1), (2) ± 2,5 K (kuni 600 K) (1), (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dünaamiline meetod	± 0,5 K (kuni 600 K) (2)	
Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)	± 0,5 K (kuni 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboffi meetod	± 2 K (kuni 600 K) (2)	
Määramine fotoraku abil	± 0,3 K (373 K juures) (2)	
Diferentsiaaltermoanalüüs	± 0,5 K (kuni 600 K) ± 2,0 K (kuni 1 273 K)	ASTM E 537-76
Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria	± 0,5 K (kuni 600 K) ± 2,0 K (kuni 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) See täpsus kehtib ainult lihtsa, näiteks ASTM D 1120-72 kirjeldusele vastava seadme puhul; keerukamate ebulliomeetrite abil on täpsust võimalik suurendada.

(2) Kehtib ainult puhaste ainete puhul. Muudel juhtudel kasutamist tuleb põhjendada.

▼B

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

Osade katsemeetodite kirjeldus on ära toodud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standarditес (vt liidet).

1.6.1. **Ebulliomeeter**

Vt liidet.

1.6.2. **Dünaamiline meetod**

Vt katsemeetodit A.4 aururõhu määramiseks.

Registreeritakse 101 325 kPA avaldatavale rõhule vastav keemistemperatuur.

1.6.3. **Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)**

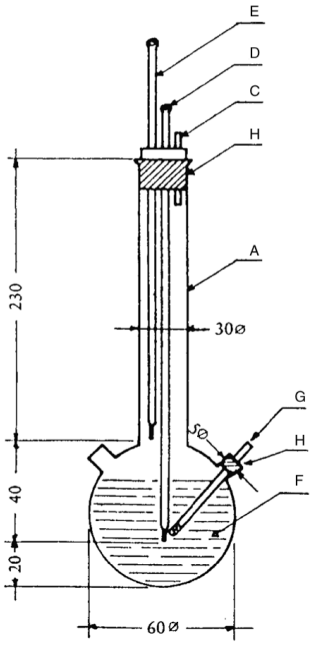
Vt liidet.

1.6.4. **Siwoloboffi meetod**

Ligikaudu 5 mm läbimõõduga katseklaasis olevat proovi kuumutatakse sulamistemperatuuri määramise seadmes (joonis 1).

Joonisel 1 on näidatud standarditud klaasist sulamis- ja keemistemperatuuri määramise seade (JIS K 0064) (kõik mõõdud on millimeetrites).

Joonis 1



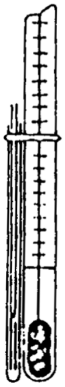
A: Mõõtmisnõu
B: Kork
C: Õhuava
D: Termomeeter
E: Lisatermomeeter
F: Vannivedelik
G: Kuni 5 mm välisdiameetriga katseklaas, mille sees on ligikaudu 100 mm pikkune, ligikaudu 1 mm sisediameetri ja ligikaudu 0,2-0,3 mm seinapaksusega kapillaartoru
H: Külgtoru

Katseklaasi paigutatakse alumisest otsast ligikaudu 1 cm kauguselt kinni joodetud kapillaartoru (keedukapillaar). Lisatava testaine kogus valitakse selline, et kapillaartoru kinnijoodetud osa jääb allapoole vedeliku pinda. Keedukapillaariga katseklaas seotakse kas kummipaelaga termomeetri külge või kinnitatakse külgtoega (vt joonist 2).

▼B

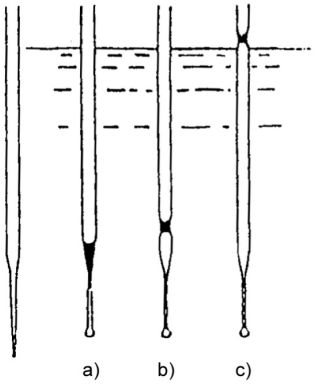
Joonis 2

Siwoloboffi meetod



Joonis 3

Muudetud meetod



Vedelikuvannis kuumutamisel kasutatav vedelik valitakse keemistemperatuuri järgi. Temperatuuridel kuni 573 K võib kasutada silikoonõli. Parafiinõli võib kasutada maksimaalselt temperatuurini 473 K. Vannivedelikku soojendatakse nii, et temperatuur tõuseb umbes 3 K/min. Vannivedelikku tuleb segada. Umbes 10 K enne eeldatava keemistemperatuurini jõudmist vähendatakse soojendamist nii, et temperatuur tõuseb kiirusega alla 1 K/min. Keemistemperatuuri lähenedes hakkab keedukapillaarist kiiresti mulle eralduma.

Keemistemperatuur on selline temperatuur, mille juures mullide voog kiirel jahutamisel katkeb ning vedelikunivoo kapillaartorus hakkab järsult tõusma. Termomeetri vastav näit ongi aine keemistemperatuur.

Muudetud meetodi (joonis 3) kohaselt määratakse keemistemperatuur sulamistemperatuuri määramisel kasutatavas kapillaartorus. Selle ots tõmmatakse umbes 2 cm pikkuses peeneks (a) ja kapillaartorusse imetakse väike kogus proovi. Kapillaartoru avatud ots joodetakse kinni, nii et tippu jääb väike õhumull. Kuumutamisel sulamistemperatuuri määramise seadmes (b) õhumull paisub. Keemistemperatuur vastab temperatuurile, mille juures ainekork tõuseb vannivedeliku pinna tasemeni (c).

1.6.5. **Määramine fotoraku abil**

Kapillaartorus olevat proovi kuumutatakse soojendatavas metallplokis.

Plokis olevate vastavate avade kaudu juhitakse läbi aine täppiskaliibritud fotorakule suunatud valguskiir.

Proovi temperatuuri tõusmisel hakkab keedukapillaarist üksikuid mulle eralduma. Keemistemperatuurile lähenedes kasvab eralduvate mullide arv märgatavalt. Selle tulemusel fotorakus registreeritava valguse intensiivsus suureneb ja saadab plokis asuva plaatinatakistustermomeetri temperatuuri näidikule stoppsignaali.

Meetod on väga mugav, kuna võimaldab ilma seadet muutmata mõõta keemistemperatuuri ka allpool toatemperatuuri kuni 253,15 K (–20 ^{o}C). Selleks tuleb seade lihtsalt jahutusvanni paigutada.

▼B

1.6.6. **Termoanalüüs**

1.6.6.1. *Diferentsiaaltermoanalüüs*

Vt liidet.

1.6.6.2. *Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria*

Vt liidet.

2. **ANDMED**

Väikestel lahknevustel normaalrõhust (kuni ± 5 kPa) normaliseeritakse keemistemperatuuri väärtused keemistemperatuurile normaalrõhul (T_n) järgmise Sidney Youngi arvväärtus-võrrandi abil:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

kus:

Δp = (101,325 – p) (vt märki)

p = mõõdetud rõhk (kPa)

f_T = keemistemperatuuri muutuse sõltuvus rõhust (K/kPa)

T = mõõdetud keemistemperatuur (K)

T_n = normaalrõhule parandatud keemistemperatuur (K)

Paljude ainete temperatuuriparandustegurid (f_T) ning valemid nende ligikaudseks arvutamiseks on ära toodud eespool nimetatud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites.

Näiteks toob DIN 53171 ära järgmised ligikaudsed parandustegurid värvides kasutatavatele lahustitele:

Tabel 2.

Temperatuuriparandustegurid f_T

Temperatuur T (K)	Parandustegur f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,4
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— kasutatud meetodit;

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetapi kirjeldust (kui seda on rakendatud);

— hinnangulist täpsust.

Keemistemperatuurina registreeritakse vähemalt kahe hinnangulise täpsuse piiridesse (vt tabel 1) jääva mõõtetulemuse keskmine.

Ära tuuakse nii mõõdetud keemistemperatuurid kui ka nende keskmine; rõhud, mille juures mõõtmised tehti, registreeritakse kilopaskalites (kPa). Eelistatavalt peaks rõhk olema lähedane normaalrõhule.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

4. **VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.

3. R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Liide

Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega.

1. **Ebulliomeeter**

1.1. Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Diferentsiaaltermoanalüüs ja skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

▼B

A.3. SUHTELINE TIHEDUS

1. MEETOD

Kirjeldatud meetodid põhinevad OECD katsesuunisel (1). Meetodite tööpõhimõte on ära toodud viites (2).

1.1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatud suhtelise tiheduse määramise meetodid sobivad kohaldamiseks nii tahketele kui vedelatele ainetele, olenemata nende puhtusastmest. Tabelis 1 on ära toodud mitmesugused meetodid.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Tahkete ainete ja vedelike suhteline tihedus D^{20}_4 on 20 °C juures määratud kindla mahuga aine massi ja 4 °C juures määratud sama mahuga veekoguse massi suhe. Suhtelisel tihedusel puudub ühik.

Aine tihedus (p) on tema massi (m) ja mahu (v) suhe.

Tihedus (p) esitatakse SI-ühikutes (kg/m^3).

1.3. VÕRDLUSAINED (1, 3)

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kasutatakse nelja tüüpi meetodeid.

1.4.1. **Ujuvusmeetodid**

1.4.1.1. *Hüdromeeter* (vedelike jaoks)

Küllalt täpselt ja kiiresti saab tihedust määrata ujukhüdromeetrite abil, mille skaalajaotised võimaldavad vedeliku tiheduse määrata sukeldunud osa pikkuse põhjal.

1.4.1.2. *Hüdrostaatilised kaalud* (vedelike ja tahkete ainete jaoks)

Proovi tihedust on võimalik määrata selle õhus ja sobivas vedelikus (nt vees) mõõdetud masside vahe põhjal.

Tahkete ainete puhul iseloomustab leitud tihedus ainult konkreetset proovi. Vedelike tiheduse määramiseks kaalutakse teadaoleva ruumalaga (v) keha kõigepealt õhus ja siis vedelikus.

1.4.1.3. *Sukeldatud keha meetod* (vedelike jaoks) (4)

Selle meetodi kohaselt määratakse vedeliku tihedus vedeliku kaalumisel enne ja pärast teadaoleva ruumalaga keha sukeldamist uuritavasse vedelikku saadud masside vahe põhjal.

▼B

1.4.2. **Püknomeetrit rakendavad meetodid**

Meetodid sobivad nii tahketele ainetele kui ka vedelikele, võimalik on kasutada erineva kujuga ja kindla ruumalaga püknomeetreid. Tihedus arvutatakse täis ja tühja püknomeetri masside vahe ja püknomeetri teadaoleva ruumala põhjal.

1.4.3. **Õhkvõrdluspüknomeeter** (tahkete ainete jaoks)

Gaasvõrdluspüknomeetri abil on toatemperatuuril võimalik määrata mis tahes kujul oleva tahke aine tihedust. Aine ruumala mõõdetakse õhu või inertgaasiga täidetud muutuva kaliibritud mahuga silindris. Tiheduse arvutamiseks määratakse pärast ruumala mõõtmist aine mass.

1.4.4. **Resonantstihedusmõõtur** (5, 6, 7)

Vedeliku tihedust on võimalik määrata resonantstihedusmõõturi abil. U-toruna konstrueeritud mehaaniline ostsillaator pannakse vibreerima ostsillaatori massist sõltuval resonantssagedusel. Proovi viimine U-torru muudab ostsillaatori resonantssagedust. Seade tuleb kaliibrida kahe vedelikuga, mille tihedus on teada. Vedelike valimisel tuleks eelistada selliseid, mille tihedused hõlmavad mõõdetavat vahemikku.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Erinevate suhtelise tiheduse määramise meetodite kohaldatavust kirjeldatakse allpool olevas tabelis.

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

Liites on täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks esitatud näidetena standardeid.

Katsed tuleb läbi viia 20 ^{o}C juures ja teha tuleb vähemalt kaks mõõtmist.

2. **ANDMED**

Vt standardeid.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— kasutatud meetodit;

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetapi kirjeldust (kui seda on rakendatud).

Suhteline tihedus D_4^{20} registreeritakse vastavalt punkti 1.2 definitsioonile koos analüüsitava aine füüsikalise olekuga.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

▼B

Tabel.

Meetodite rakendatavus

Mõõtmismeetod	Tihedus		Maksimaalne võimalik dünaamiline viskoossus	Olemasolevad standardid
	tahke aine	vedelik		
1.4.1.1. Hüdromeeter		jah	5 Pa· s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2. Hüdrostaatilised kaalud				
a) tahked ained	jah			ISO 1183 (A)
b) vedelikud		jah	5 Pa· s	ISO 901 ja 758
1.4.1.3. Sukeldatud keha meetod		jah	20 Pa· s	DIN 53217
1.4.2. Püknomeeter				ISO 3507
a) tahked ained	jah			ISO1183(B) NF T 20-053
b) vedelikud		jah	500 Pa· s	ISO 758
1.4.3. Õhkvõrdluspüknomeeter	jah			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Resonantstihedusmõõtur		jah	5 Pa· s	

4. **VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

3. IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

4. Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11,427–430.

5. Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297-302.

6. Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717-726.

7. Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253-255.

▼B

Liide

Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega.

1. **Ujuvusmeetodid**

1.1. Hüdromeeter

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids – Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Hüdrostaatilised kaalud

Tahkete ainete jaoks

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Vedelike jaoks

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 ja ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Sukeldatud keha meetod

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **Püknomeetrit rakendavad meetodid**

2.1. Vedelike jaoks

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than l00.10-6 m2 s-1 at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than l00 . 10-6 m^2 s-1 at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol – water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products – chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary- stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

▼B

2.2.	Tahkete ainete jaoks	
	ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
	NF T 20-053	Chemical products for industrial use -Determination of density of solids in powder and liquids -Pyknometric method
	DIN 19683	Determination of the density of soils
3.	**Õhkvõrdluspüknomeeter**	
	DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. AURURÕHK

1. METOODIKA

Käesolev metoodika on samaväärne standardiga OECD TG 104 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolevas metoodika A.4(1) uuesti läbi vaadatud versioonis on esitatud üks täiendav mõõtemeetod, „Efusioonmeetod: isotermiline termogravimeetria"; see on välja töötatud väga madala aururõhuga (kuni 10^{-10} Pa) ainete jaoks. Arvestades vajadust meetodite järele, mis võimaldavad mõõta eeskätt madala aururõhuga ainete aururõhku, on ümber hinnatud ka käesoleva metoodika muude mõõtemeetodite rakenduspiirid.

Termodünaamilise tasakaalu tingimustes sõltub puhta aine aururõhk ainult temperatuurist. Asjaomased põhimõtted on esitatud mujal (2, 3).

Ükski mõõtmismeetod ei ole rakendatav kogu aururõhkude vahemikus – vähem kui 10^{-10} Pa kuni 10^{5} Pa. Sellepärast esitatakse käesolevas kirjelduses kaheksa aururõhu mõõtmise meetodit, mis on rakendatavad erinevates aururõhu vahemikes. Tabelis 1 on võrreldud nende meetodite rakendatavust ja mõõtevahemikke. Neid meetodeid saab kasutada üksnes ainete puhul, mis mõõtmistingimustes ei lagune. Juhul kui tehnilistel põhjustel eksperimentaalseid meetodeid ei saa kasutada, võib aururõhku ka hinnata; soovitatav hindamismeetod on esitatud liites.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Aine aururõhk on tema küllastatud auru rõhk vedelas või tahkes faasis oleva aine kohal.

Tuleb kasutada rahvusvahelise mõõtühikute süsteemi (SI) rõhuühikut, milleks on paskal (Pa). Varem kasutusel olnud rõhuühikud ja nende teisendustegurid on järgmised:

1 torr	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^{2}$ Pa
1 atmosfäär	=	$1{,}013 \times 10^{5}$ Pa		
1 baar	=	10^{5} Pa		

SI temperatuuriühik on kelvin (K). Celsiuse kraadid teisendatakse kelviniteks järgmise valemi abil:

$$T = t + 273{,}15$$

kus T on kelvinites väljendatud termodünaamiline temperatuur ja t on temperatuur Celsiuse kraadides.

▼**M1**

Tabel 1

Mõõtmismeetod	Aine		Hinnanguline korratavus	Hinnanguline reprodutseeritavus	Soovitatav mõõtevahemik
	Tahke	Vedelik			
Dünaamiline meetod	Kergsulav	Jah	kuni 25 % 1–5 %	kuni 25 % 1–5 %	10^3 Pa kuni 2 × 10^3 Pa, 2 × 10^3 Pa kuni 10^5 Pa
Staatiline meetod	Jah	Jah	5–10 %	5–10 %	10 Pa kuni 10^5 Pa, 10^{-2} Pa kuni 10^5 Pa (1)
Isoteniskoopiline meetod	Jah	Jah	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa kuni10^5 Pa
Efusioonmeetod: aururõhukaalud	Jah	Jah	5–20 %	kuni 50 %	10^{-3} kuni 1 Pa
Efusioonmeetod: Knudseni rakk	Jah	Jah	10–30 %	—	10^{-10} kuni 1 Pa
Efusioonmeetod: isotermiline termogravimeetria	Jah	Jah	5–30 %	kuni 50 %	10^{-10} kuni 1 Pa
Gaasiküllastusmeetod	Jah	Jah	10–30 %	kuni 50 %	10^{-10} kuni 10^3 Pa
Pöörleva kuuli meetod	Jah	Jah	10–20 %	—	10^{-4} kuni 0,5 Pa

(1) Mahtuvusmanomeetri kasutamise korral.

1.3. MÕÕTMISE PÕHIMÕTE

Üldiselt määratakse aururõhku erinevatel temperatuuridel. Kitsas temperatuurivahemikus sõltub puhta aine aururõhu logaritm lineaarselt termodünaamilisest temperatuurist vastavalt lihtsustatud Clapeyron-Clausiuse võrrandile:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + constant$$

kus:

p = aururõhk, Pa,

ΔHv = aurustumissoojus, $Jmol^{-1}$,

R = universaalne gaasikonstant, 8,314 $Jmol^{-1}K^{-1}$,

T = temperatuur, K.

▼**M1**

1.4. STANDARDAINED

Standardaineid ei ole tingimata vaja kasutada. Neid on vaja eeskätt selleks, et aeg-ajalt kontrollida meetodi suutlikkust ja võrrelda eri meetodite abil saadud tulemusi.

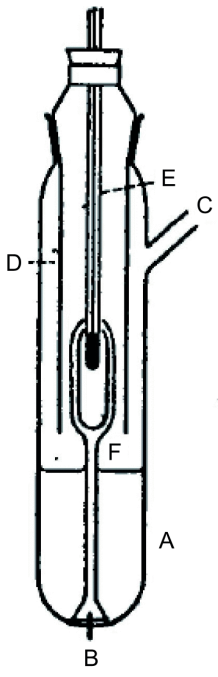
1.5. MEETODITE KIRJELDUS

1.5.1. **Dünaamiline meetod (Cottrelli meetod)**

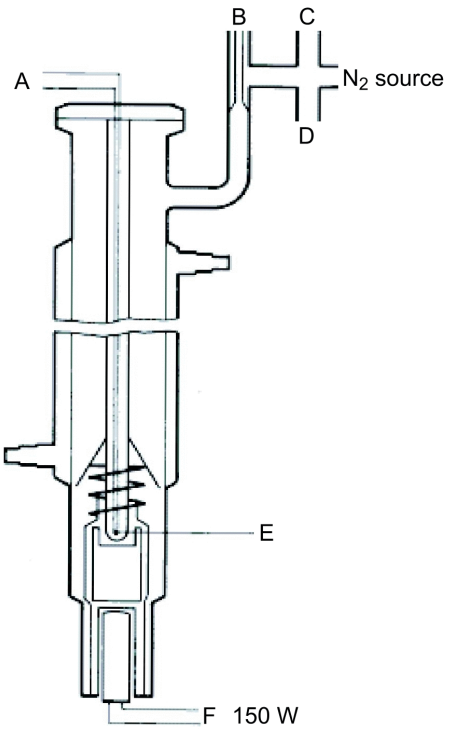
1.5.1.1. *Põhimõte*

Aururõhu määramiseks mõõdetakse aine keemistemperatuur erinevatel teadaolevatel rõhkudel ligikaudu 10^3–10^5 Pa vahemikus. Seda meetodit soovitatakse ka keemistemperatuuri määramiseks. Selleks saab kõnesolevat meetodit kasutada kuni temperatuurini 600 K. Vedelikusamba hüdrostaatilise rõhu tõttu on vedeliku keemistemperatuur 3–4 cm sügavusel ligikaudu 0,1 °C kõrgem kui vedeliku pinnal. Cottrelli meetodi (4) puhul asetatakse termomeeter aurudesse vedeliku pinna kohal ja keeval vedelikul lastakse pidevalt voolata üle termomeetri reservuaari. Termomeetri reservuaar on pidevalt kaetud õhukese vedelikukihiga, mis on tasakaalus atmosfäärirõhul oleva auruga. Seega vastab termomeetri näit tõelisele keemistemperatuurile, kusjuures mõõtmistulemus ei sisalda ülekuumenemisest või hüdrostaatilisest rõhust tingitud viga. Cottrelli poolt algselt kasutatud pump on kujutatud joonisel 1. Katseklaasis A on keev vedelik. Põhja külge joodetud plaatinatraat soodustab ühtlast keemist. Külgtoru C on ühendatud püstjahutiga; pritsmekaitse D ei lase termomeetril E puutuda kokku külma kondensaadiga. Kui vedelik katseklaasis A keeb, tõusevad lehtrisse sattunud mullid ja vedelik üles ning suunatakse pumba F kahte haru pidi termomeetri reservuaarile.

Joonis 1



Joonis 2



▼**M1**

Cottrelli pump (4)

A: termopaar

B: anum vaakumi stabiliseerimiseks

C: manomeeter

D: vaakumpump

E: mõõtmispunkt

F: kütteelement, ligikaudu 150 W

1.5.1.2. *Mõõteseade*

Joonisel 2 on kujutatud suurt täpsust võimaldav mõõteseade, milles on kasutatud Cottrelli põhimõtet. See kujutab endast toru, mille alumises osas keeb vedelik, keskmine osa kujutab endast jahutit ning ülemises osas on väljumisava ja äärik. Cottrelli pump asub keemissektsioonis, mida kütab elektriline padrunkuumuti. Temperatuuri mõõdetakse kaetud termopaari või takistustermomeetri abil, mis on viidud torusse ülevalt läbi äärikliite. Väljumisava on ühendatud rõhu reguleerimise süsteemiga. See hõlmab vaakumpumpa, anumat vaakumi stabiliseerimiseks, manostaati, millest lastakse seadmesse rõhu reguleerimiseks vajalikku lämmastikku, ja manomeetrit.

1.5.1.3. *Mõõtmise käik*

Aine viiakse keemissektsiooni. Kui tahke aine ei ole pulbri kujul, võib seejuures esineda raskusi, mille puhul mõnikord aitab jahutussärgi kuumutamine. Seade suletakse äärikliitega ja ainest eemaldatakse gaasid. Vahutavate ainete aururõhku ei saa selle meetodiga mõõta.

Seade reguleeritakse kõige madalamale vajalikule rõhule ja lülitatakse sisse küte. Samal ajal ühendatakse temperatuuriandur registreerimisseadmega.

Kui püsival rõhul registreeritakse püsiv keemistemperatuur, on saavutatud tasakaal. Eriti tuleb jälgida, et keemine ei oleks tõukeline. Lisaks sellele peab jälgima, et kondenseerumine jahutis oleks täielik. Kui määratakse kergsulava tahke aine aururõhku, tuleb jälgida, et jahuti ei ummistuks.

Pärast tasakaalupunkti registreerimist reguleeritakse seade kõrgemale rõhule. Mõõtmisi jätkatakse samal viisil, kuni saavutatakse rõhk 10^5 Pa (aururõhk mõõdetakse kokku ligikaudu 5–10 tasakaalupunktis). Kontrolliks korratakse mõõtmist tasakaalupunktides alaneva rõhu järjekorras.

1.5.2. **Staatiline meetod**

1.5.2.1. *Põhimõte*

Staatilise meetodi (5) puhul määratakse termodünaamilisele tasakaalule vastav aururõhk kindlaksmääratud temperatuuril. See meetod sobib individuaalsete ainete ning mitmekomponendiliste vedelike ja tahkete ainete segude puhul rõhuvahemikus 10^{-1} kuni 10^5 Pa ja, kui rakendatakse ettevaatusabinõusid, ka rõhuvahemikus 1–10 Pa.

▼**M1**

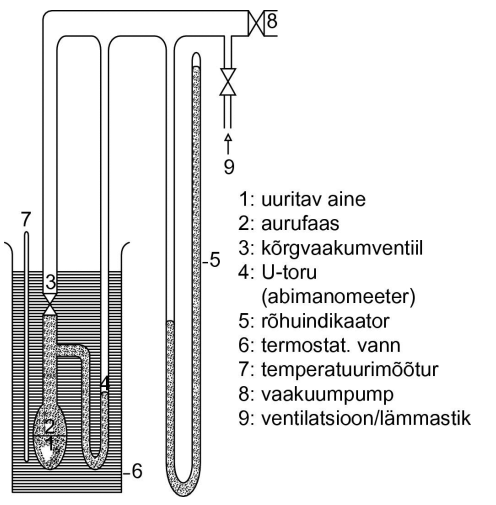
1.5.2.2. *Mõõteseade*

Mõõteseade koosneb termostateeritud vannist (täpsus ± 0,2 K), vaakumsüsteemiga ühendatud proovinõust, manomeetrist ja rõhu reguleerimise süsteemist. Proovinõu (joonis 3a) ühendatakse kraani ja nullindikaatorina kasutatava diferentsiaalmanomeetri (sobiva manomeetrivedelikuga U-toru) kaudu vaakumsüsteemiga. Olenevalt rõhuvahemikust ja uuritava aine keemilistest omadustest võib diferentsiaalmanomeetris kasutada elavhõbedat, silikoonõlisid või ftalaate. Keskkonnakaitse kaalutlustel tuleks elavhõbeda kasutamisest võimaluse korral hoiduda. Uuritav aine ei tohi U-torus olevas vedelikus märgatavalt lahustuda või sellega reageerida. U-toru asemel võib kasutada ka mõnda muud rõhumõõturit (joonis 3b). Normaalrõhust kuni rõhuni 10^2 Pa võib manomeetrivedelikuna kasutada elavhõbedat; kui rõhk on vahemikus 10–10^2 Pa, võib kasutada silikoonõlisid ja ftalaate. Rõhul alla 10^2 Pa võib kasutada ka muid rõhumõõtureid; kuumutatava membraaniga mahtuvusmanomeetrit võib kasutada isegi rõhul alla 10^{-1} Pa. Temperatuuri mõõdetakse kas proovinõu seina välisküljel või proovinõus.

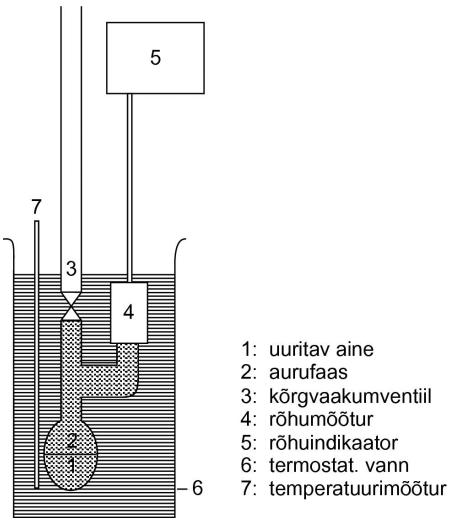
1.5.2.3. *Mõõtmise käik*

Kui kasutatakse joonisel 3a kujutatud mõõteseadet, täidetakse U-toru selleks valitud vedelikuga, mis tuleb enne näidu registreerimist gaasidest kõrgendatud temperatuuri abil vabastada. Uuritav aine viiakse mõõteseadmesse ja vabastatakse gaasidest madalal temperatuuril. Kui tegemist on mitmekomponendilise prooviga, peab temperatuur olema piisavalt madal, et seejuures ei muutuks materjali koostis. Tasakaalu kiiremaks saavutamiseks võib proovi segada. Proovi võib jahutada vedela lämmastiku või kuiva jääga, kuid seejuures tuleb jälgida, et õhk ja väljapumbatav gaas ei kondenseeruks. Proovinõu kohal oleva kraani avamisega ühendatakse nõu mõneks minutiks vaakuumsüsteemiga, et eemaldada õhk. Vajaduse puhul korratakse gaaside eemaldamist mitu korda.

Joonis 3a



Joonis 3b



▼**M1**

Kui proovi kuumutamise ajal on kraan suletud, siis aururõhk tõuseb. See muudab U-torus oleva vedeliku tasakaaluasendit. Selle kompenseerimiseks lastakse seadmesse lämmastikku või õhku, kuni diferentsiaalrõhu indikaator on uuesti nullasendis. Selleks vajalik rõhk loetakse manomeetrilt või suurema täpsusega mõõteriistalt. See rõhk vastab aine aururõhule mõõtmistemperatuuril. Kui kasutatakse joonisel 3b kujutatud mõõteseadet, võib aururõhu näidu lugeda otse seadmelt.

Aururõhk määratakse piisavalt väikeste temperatuurivahemike tagant kuni vajaliku kõrgeima temperatuurini (aururõhk mõõdetakse kokku umbes 5–10 tasakaalupunktis).

Kontrolliks korratakse näitude registreerimist madalal temperatuuril. Kui kordamisel saadud väärtused ei lange kokku temperatuuri tõstmisel saadud kõveraga, võib põhjuseks olla üks järgmistest asjaoludest:

i) proov sisaldab ikka veel õhku (nt suure viskoossusega materjalide puhul) või kuumutamisel eraldunud madala keemistemperatuuriga aineid;

ii) uuritavas temperatuurivahemikus toimub ainega keemiline reaktsioon (nt lagunemine või polümerisatsioon).

1.5.3. **Isoteniskoopiline meetod**

1.5.3.1. *Põhimõte*

Isoteniskoop (6) töötab staatilise meetodi põhimõttel. Proov viiakse termostateeritud kolbi, mis on ühendatud manomeetri ja vaakumpumbaga. Uuritavast ainest kergemini lenduvad lisandid eemaldatakse degaseerimisega alarõhul. Proovi aururõhk valitud temperatuuril tasakaalustatakse inertse gaasi rõhuga, mille väärtus on teada. Isoteniskoop töötati välja teatavate vedelate süsivesinike aururõhu määramiseks, kuid ta sobib ka tahkete ainete uurimiseks. Harilikult ei sobi kõnesolev meetod mitmekomponendiliste süsteemide puhul kasutamiseks. Mittelenduvaid lisandeid sisaldavate proovide korral on mõõtmistulemuste viga väike. Soovitatav määramisvahemik on 10^2–10^5 Pa.

1.5.3.2. *Mõõteseade*

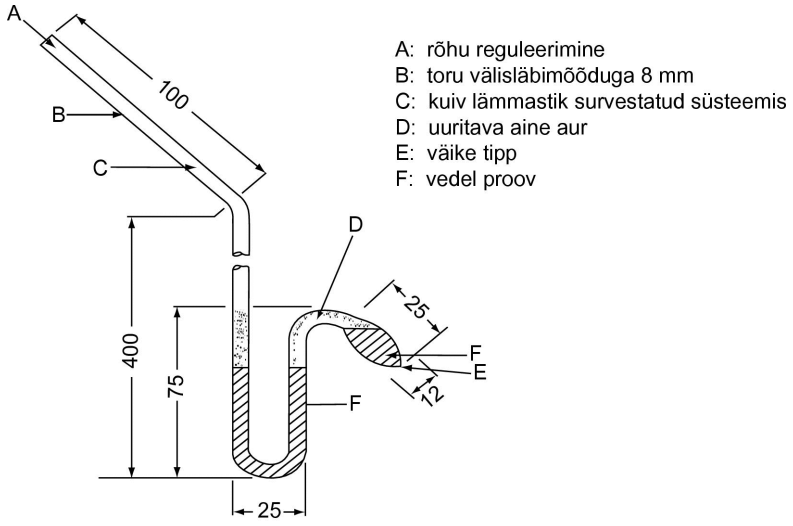
Mõõteseadme näidis on esitatud joonisel 4. Seadme täielik kirjeldus on standardis ASTM D 2879–86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Mõõtmise käik*

Vedelate ainete puhul on diferentsiaalmanomeetri vedelikuks uuritav aine ise. Isoteniskoopi viiakse vedelikukogus, mis on küllaldane reservuaari ja manomeetri lühikese haru täitmiseks. Isoteniskoop ühendatakse vaakumsüsteemiga, sellest eemaldatakse õhk ning see täidetakse seejärel lämmastikuga. Süsteemist gaasi väljapumpamist ja süsteemi täitmist lämmastikuga korratakse kaks korda, et eemaldada kogu hapnik. Täidetud isoteniskoop asetatakse horisontaalselt, nii et proov valgub õhukese kihina reservuaaris ja manomeetris laiali. Rõhk süsteemis langetatakse 133 paskalini ja proovi kuumutatakse ettevaatlikult, kuni see hakkab keema (seda tehakse lahustunud gaaside kõrvaldamiseks). Isoteniskoop asetatakse seejärel nii, et proov voolab tagasi reservuaari ja täidab manomeetri lühikese haru. Rõhku hoitakse 133 Pa juures. Proovireservuaari väljavenitatud tippu kuumutatakse väikesel leegil, kuni proovi aurud küllaldaselt paisuvad ning suruvad osa proovist reservuaari ülaosast ja manomeetri lühikesest harust manomeetri ülejäänud ossa, nii et tekib auruga täidetud lämmastikuvaba ruum. Isoteniskoop paigutatakse seejärel termostateeritud vanni ja lämmastiku rõhk võrdsustatakse proovipoolse ruumi rõhuga. Tasakaaluolekus on lämmastiku rõhk võrdne aine aururõhuga.

Joonis 4



(mõõtmed on millimeetrites)

Tahkete ainete puhul kasutatakse rõhust ja temperatuurivahemikust olenevalt selliseid manomeetrivedelikke, nagu silikoonõlid ja ftalaadid. Gaasidest vabastatud manomeetrivedelik viiakse isoteniskoobi pikal harul olevasse laiemasse ossa. Uuritav tahke aine pannakse proovikolbi ja vabastatakse gaasidest kõrgendatud temperatuuril. Seejärel kallutatakse isoteniskoopi nii, et manomeetrivedelik voolab U-torusse.

▼M1

1.5.4. **Efusioonmeetod: aururõhukaalud** (7)

1.5.4.1. *Põhimõte*

Uuritava aine proovi kuumutatakse väikeses ahjus ja asetatakse vakumeeritud klaaskupli alla. Ahi on kaetud kaanega, milles on väikesed teadaoleva läbimõõduga avad. Ühest avast väljuv aine aur juhitakse sama vakumeeritud klaaskupli all asuva kõrgtundliku kaalu kausile. Mõne seadmetüübi puhul asub kaalukauss külmkambris, mis tagab soojuse hajumise väljapoole soojusjuhtivuse teel; kaalukauss jahtub soojuskiirguse arvel ja avast väljuv aur kondenseerub kaalukausil. Aurujoa impulss toimib kaalukausile mõjuva jõuna. Aururõhu võib arvutada kahel viisil: kas otse kaalukausile mõjuva jõu põhjal või aurustumiskiiruse alusel, kasutades Hertz-Knudseni valemit (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\,\pi RT \times 10^3}{M}}$$

kus:

G = aurustumiskiirus ($kgs^{-1}m^{-2}$),

M = molaarmass ($gmol^{-1}$),

T = temperatuur (K),

R = universaalne gaasikonstant ($Jmol^{-1}K^{-1}$),

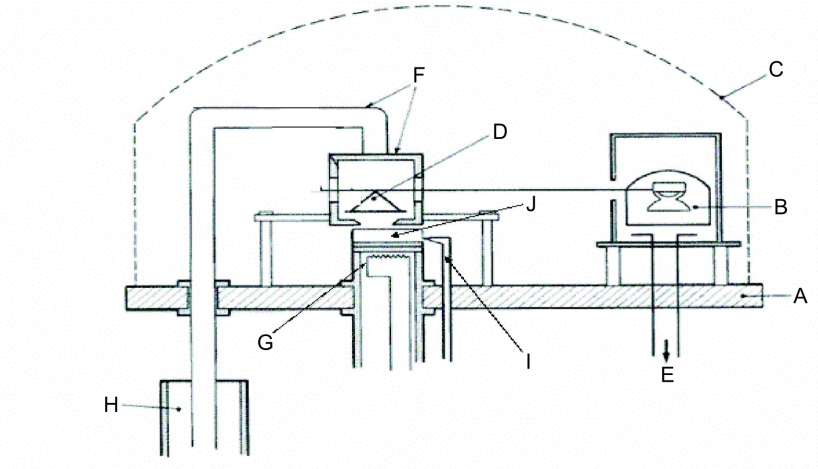
p = aururõhk (Pa).

Soovitatav määramisvahemik on 10^{-3} kuni 1 Pa.

1.5.4.2. *Mõõteseade*

Seadme üldpõhimõte on esitatud joonisel 5.

Joonis 5



A: alusplaat

B: magnetelektriline seade

C: klaaskuppel

D: kaalud ja kaalukauss

E: vaakumimõõtur

F: külmkamber ja jahutuslatt

G aurustusahi

H: Dewari anum vedela lämmastikuga

I: proovi temperatuuri mõõtur

J: uuritav proov

▼**M1**

1.5.5. **Efusioonmeetod: Knudseni rakk**

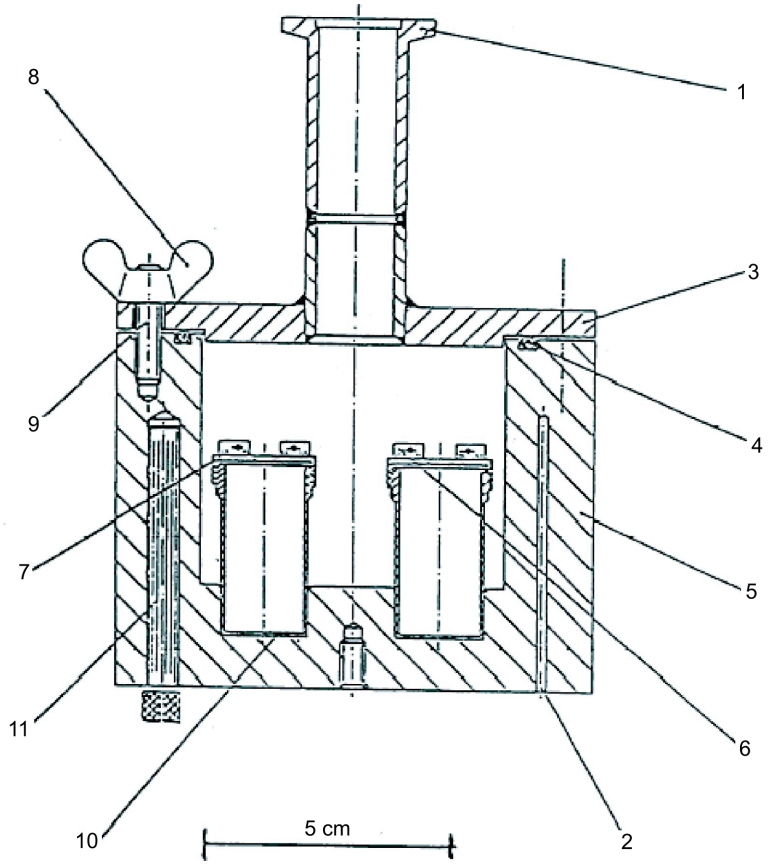
1.5.5.1. *Põhimõte*

Meetodi aluseks on kõrgvaakumi tingimustes Knudseni raku (8) mikroavast ajaühikus auruna väljuva uuritava aine massi määramine. Väljavoolanud auru massi võib leida kas raku massi vähenemise määramise kaudu või auru madalal temperatuuril kondenseerimise ja lendunud ainekoguse kromatograafilise määramisega. Aururõhk arvutatakse Hertz-Knudseni võrrandi abil (vt punkt 1.5.4.1), kasutades seadme parameetritest sõltuvat parandustegurit (9). Soovitatav aururõhu vahemik on 10^{-10} kuni 1 Pa (10, 11, 12, 13, 14).

1.5.5.2. *Mõõteseade*

Seadme üldpõhimõte on esitatud joonisel 6.

Joonis 6



1:	ühendus vaakumsüsteemiga	7:	keermega kaas
2:	pesad plaatina-takistustermomeetri või temperatuuri mõõtmise ja reguleerimise seadme jaoks	8:	liblikmutrid
3:	vaakummahuti kaas	9:	poldid
4:	O-rõngas	10:	roostevabast terasest efusioonirakud
5:	alumiiniumist vaakummahuti	11:	padrunkuumuti
6:	efusioonirakkude paigaldamise ja eemaldamise seade		

▼**M1**

1.5.6. **Efusioonmeetod: isotermiline termogravimeetria**

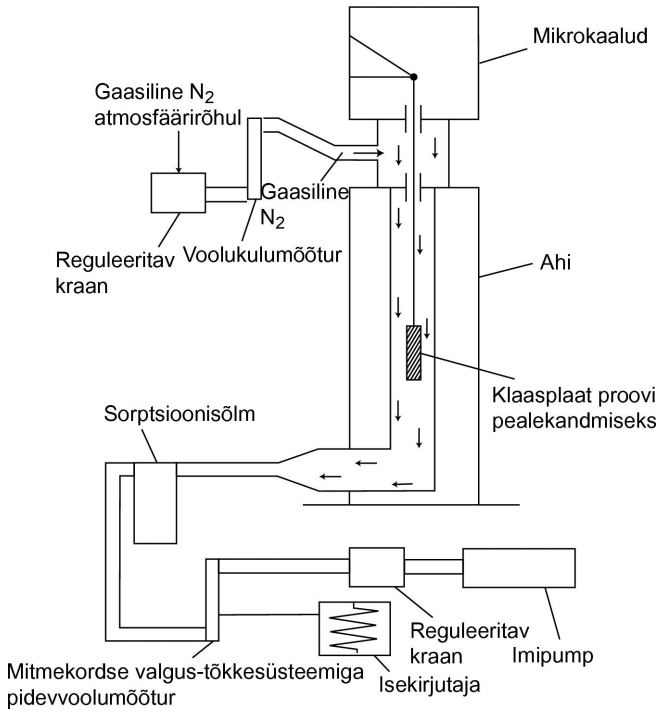
1.5.6.1. *Põhimõte*

Meetod põhineb uuritava aine kiirenenud aurustumise määramisel kõrgendatud temperatuuril ja normaalrõhul termogravimeetria abil (10, 15, 16, 17, 18, 19, (20). Aurustumiskiiruse v_T määramiseks hoitakse uuritavat ainet aeglaselt voolava inertgaasi atmosfääris kindlaksmääratud isotermilisel temperatuuril T (kelvinites) ja jälgitakse vajaliku ajavahemiku jooksul, kuidas väheneb ainekoguse mass. Aururõhud p_T arvutatakse v_T väärtuste põhjal, kasutades aururõhu logaritmi ja aurustumiskiiruse logaritmi lineaarset seost. Vajaduse korral võib tulemused ekstrapoleerida temperatuuridele 20 ja 25 °C, rakendades regressioonanalüüsi koordinaatides log p_T *vs.* 1/T. See meetod sobib ainete puhul, mille aururõhk on 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) ja puhtusaste on võimalikult lähedane 100 protsendile, et vältida mõõdetava massi vähenemise ekslikku tõlgendamist.

1.5.6.2. *Mõõteseade*

Mõõteseadme üldpõhimõte on esitatud joonisel 7.

Joonis 7



Proov kandeplaadil, mis ripub mikrokaalul reguleeritava temperatuuriga kambris, asub kuiva lämmastiku voolus, mis kannab uuritava aine aurustunud molekulid ära. Kambrist väljuv gaas puhastatakse sorptsiooniseadmes.

1.5.6.3. *Mõõtmise käik*

Uuritav aine kantakse ühtlase kihina karestatud klaasplaadi pinnale. Tahke aine puhul niisutatakse plaat ühtlaselt aine lahusega sobivas lahustis ja kuivatatakse inertgaasi atmosfääris. Ainekihiga klaasplaat riputatakse mõõtmiste tegemiseks termogravimeetrilisse analüsaatorisse ja mõõdetakse pidevalt klaasplaadi massi vähenemist ajas.

▼M1

Aurustumiskiirus v_T kindlaksmääratud temperatuuril arvutatakse proovi massi vähenemise Δm alusel järgmise valemi abil:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \, (gcm^{-2}h^{-1})$$

kus F on klaasplaati katva aine pindala (tavaliselt võrdne klaasplaadi pindalaga) ja t on aeg, mille jooksul mass vähenes.

Aururõhk p_T arvutatakse aurustumiskiirust v_T väljendava funktsiooni alusel:

$$\log p_T = C + D \log v_T$$

kus C ja D on katseseadet iseloomustavad konstandid, mis olenevad mõõtekambri läbimõõdust ja gaasivoo kiirusest. Need konstandid määratakse üks kord, mõõtes teadaoleva aururõhuga ainete seeria aurustumiskiirused ja kasutades regressioonanalüüsi log p_T *vs.* log v_T (11, 21, 22).

Aururõhu p_T ja kelvinites väljendatud temperatuuri T vahelist seost kajastab võrrand

$$\log p_T = A + B \; 1/T$$

kus A ja B on regressioonseosest log p_T *vs.* 1/T saadud konstandid. Selle võrrandi alusel saab arvutada aururõhu mis tahes muu temperatuuri juures ekstrapoleerimise teel.

1.5.7. **Gaasiküllastusmeetod** (23)

1.5.7.1. *Põhimõte*

Üle või läbi uuritava aine proovi voolutatakse toatemperatuuril inertgaasi teadaoleva piisavalt väikese kiirusega, mis tagab gaasi küllastumise. Gaasifaasi küllastamine on väga tähtis. Kaasa kandunud aine kogutakse, kasutades püüdurina enamasti sorbenti, ja määratakse selle kogus. Auru püüdmise ja edasise analüüsi alternatiivina võib kaasa kandunud materjali koguse määramiseks kasutada ka järjestikku ühendatud analüüsiseadet, näiteks gaasikromatograafi. Aururõhu arvutamisel eeldatakse, et süsteem järgib ideaalse gaasi olekuvõrrandit ja gaasisegu üldrõhk on võrdne komponentgaaside rõhkude summaga. Uuritava aine partsiaalrõhu ehk aururõhu arvutamisel lähtutakse teadaolevast gaasi ruumalast ja kaasa kantud materjali massist.

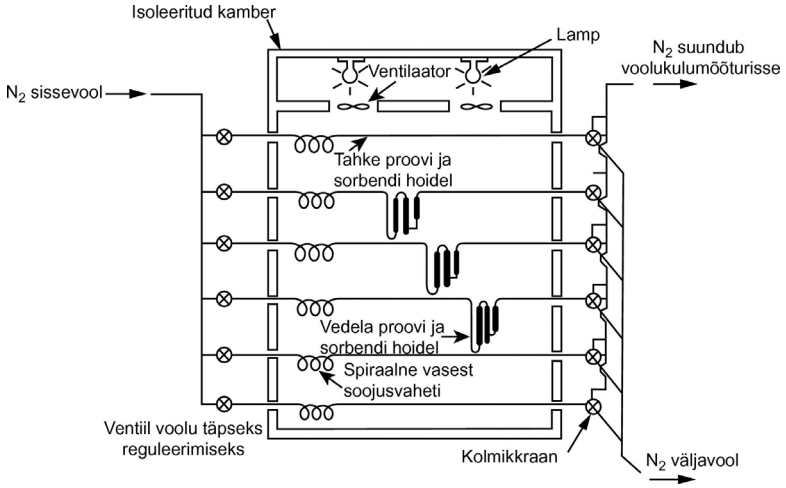
Gaasiküllastusmeetod on rakendatav nii tahkete kui ka vedelate ainete korral. Seda võib kasutada ka madalal rõhul kuni 10^{-10} Pa (10, 11, 12, 13, 14). Kõnesolev meetod on kõige usaldusväärsem aururõhul alla 10^3 Pa. Aururõhul üle 10^3 Pa saadakse tavaliselt õigetest suuremad väärtused, mis on tõenäoliselt tingitud aerosooli tekkimisest. Kuna aururõhu mõõtmised tehakse toatemperatuuril, ei ole vaja ekstrapoleerida kõrgetel temperatuuridel saadud andmeid; sellega välditakse sageli tõsiseid vigu põhjustavat ekstrapoleerimist kõrgetelt temperatuuridelt.

1.5.7.2. *Mõõteseade*

Mõõtmiseks on vaja konstantse temperatuuriga kambrit. Joonisel 8 oleval skeemil on kamber, milles on kolm hoidlit tahketele proovidele ja kolm hoidlit vedelatele proovidele; see võimaldab teha tahke või vedela prooviga kolm analüüsi. Temperatuuri reguleeritakse ± 0,5 °C või suurema täpsusega.

▼**M1**

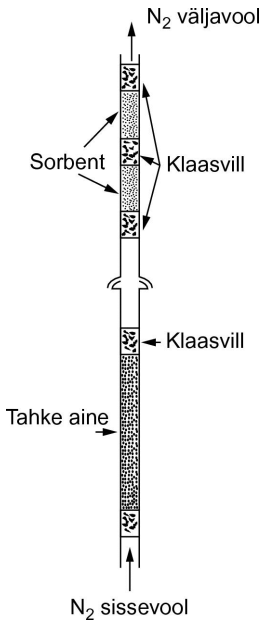
Joonis 8



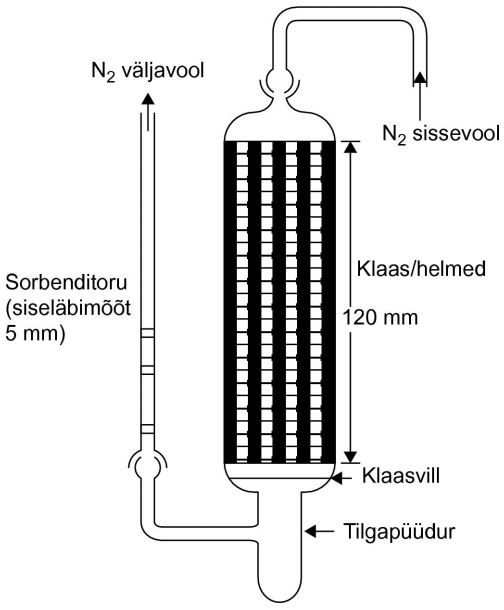
Üldiselt kasutatakse inertse kandegaasina lämmastikku, kuid mõnikord on vaja kasutada ka muid gaase (24). Kandegaas peab olema kuiv. Gaasivoog jaotatakse kueks vooks, mida reguleeritakse nõelventiilide abil (ava läbimõõt ligikaudu 0,79 mm); need vood juhitakse 3,8 mm siseläbimõõduga vasktorude kaudu kambrisse. Pärast temperatuuri tasakaalustumist läbib gaas proovi ja sorbentpüünise ning väljub kambrist.

Tahke proov asetatakse 5-millimeetrise siseläbimõõduga klaastorusse klaasvillast korkide vahele (vt joonis 9). Joonisel 10 on näidatud vedela proovi hoidel ja sorptsioonisõlm. Vedeliku aururõhu mõõtmised on kõige paremini reprodutseeritavad, kui vedelik kantakse klaashelmestele või mõnele muule inertsele sorbendile, nagu ränidioksiid, ning hoidel täidetakse selliselt kaetud helmestega. Alternatiivina võib kandegaasi voolutada läbi jämeda friti või barboteerida uuritava vedelikuga täidetud kolonni kandegaasiga.

Joonis 9



Joonis 10



▼**M1**

Sorptsioonisõlmes on eel- ja järeladsorptsiooni sektsioon. Väga madala aururõhu puhul võib olla tõsiseks probleemiks adsorptsioon proovi ning adsorbendi vahel oleval klaasvillal ja klaastorudel, kusjuures sorbendile jääb ainult väike kogus uuritavat ainet.

Tõhus viis aurustunud materjali kogumiseks on kasutada süsihappelumega jahutatavat püüdurit. Selline püüdur ei avalda vasturõhku küllastuskolonnile ja sellest on kerge püütud materjali kvantitatiivselt eemaldada.

1.5.7.3. *Mõõtmise käik*

Kandegaasi voolukiirust mõõdetakse toatemperatuuril. Voolukiirust kontrollitakse katse ajal sageli, et tagada kandegaasi üldmahu õige määramine. Parem on seda massivoolumõõturi abil pidevalt mõõta. Gaasifaasi küllastumiseks peab kokkupuuteaeg olema küllalt pikk ja gaasivoolu kiirus väike (25).

Katse lõpus analüüsitakse eel- ja järeladsorptsiooni sektsiooni eraldi. Kummastki sektsioonist desorbeeritakse uuritav aine lahusti abil. Saadud lahuseid analüüsitakse kvantitatiivselt kummastki sektsioonist desorbeeritud massi määramiseks. Analüüsimeetodi (ja ka sorbendi ja desorbeeriva lahusti) valik oleneb uuritavast ainest. Desorptsiooni täielikkuse määramiseks kantakse teadaolev kogus uuritavat proovi sorbendile, desorbeeritakse, ja määratakse aine saagis. Desorptsiooni tõhusust on vaja kontrollida samal või ligikaudu samal uuritava proovi kontsentratsioonil, mis esineb mõõtmise puhul.

Tagamaks, et kandegaas on uuritava ainega küllastunud, kasutatakse kolme erinevat gaasivoolu kiirust. Kui arvutatud aururõhk ei olene voolukiirusest, peetakse kandegaasi küllastunuks.

Aururõhk arvutatakse järgmise valemi abil:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

kus:

p = aururõhk (Pa),

W = aurustunud uuritava aine mass (g),

V = küllastunud kandegaasi maht (m^3),

R = universaalne gaasikonstant, 8,314 ($Jmol^{-1}K^{-1}$),

T = temperatuur (K),

M = uuritava aine molaarmass ($gmol^{-1}$).

Mõõdetud mahu väärtusi on vaja parandada, et arvestada rõhu ja temperatuuri erinevusi voolumõõturis ja küllastuskolonnis.

▼M1

1.5.8. **Pöörleva kuuli meetod**

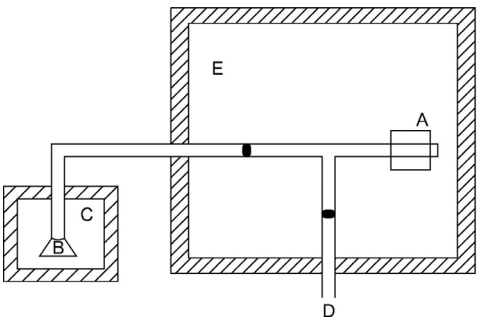
1.5.8.1. *Põhimõte*

Selle meetodi puhul kasutatakse pöörleva kuuli põhimõttel töötavat viskoossusmõõturit, mille mõõteelement on magnetväljas hõljuv väike teraskuul, mis pannakse pöörlevate magnetväljade abil pöörlema (26, 27, 28). Kuuli pöörlemiskiirust saab mõõta andurmähiste abil. Kui kuul on jõudnud ettenähtud pöörlemiskiiruseni (tavaliselt umbes 400 pööret sekundis), lõpetatakse edasine kiirendamine ja kuuli pöörlemine hakkab hõõrdumise tõttu gaasikeskkonnas aeglustuma. Mõõdetakse pöörlemiskiiruse vähenemise sõltuvust ajast. Aururõhk tuletatakse teraskuulikese pöörlemiskiiruse vähenemisest, mis oleneb rõhust. Soovitatav määramisvahemik on 10^{-4} kuni 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Mõõteseade*

Katseseadme skeem on esitatud joonisel 11. Mõõtepea asetatakse 0,1 °C täpsusega termostateeritavasse kambrisse. Proovinõu paigutatakse 0,1 °C täpsusega termostateeritud eraldi kambrisse ning seadme kõiki ülejäänud osi hoitakse kondensatsiooni vältimiseks kõrgemal temperatuuril. Kogu seade on ühendatud kõrgvaakumsüsteemiga.

Joonis 11



A: pöörleva kuuliga mõõtepea
B: proovinõu
C: termostaat
D: vaakumsüsteem (turbopump)
E: õhktermostaat

2. **MÕÕTMISANDMED JA MÕÕTMISPROTOKOLLI KOOSTAMINE**

2.1. MÕÕTMISANDMED

Mis tahes eespool kirjeldatud meetodi kasutamise puhul määratakse aururõhk vähemalt kahel temperatuuril. Aururõhu sõltuvuse lineaarsuse kontrollimiseks tuleks eelistada aururõhu määramist kolmel või enamal temperatuuril vahemikus 0–50 °C. Efusioonmeetodite (Knudseni rakk ja isotermiline termogravimeetria) ning gaasiküllastusmeetodi korral on temperatuurivahemiku 0–50 °C asemel soovitatav mõõta aururõhud vahemikus 120–150 °C.

2.2. MÕÕTMISPROTOKOLL

Mõõtmisprotokollis esitatakse järgmine teave:

— kasutatud meetod;

▼M1

— aine täpne iseloomustus (identifitseerimiseks vajalikud andmed, lisandid) ja eelneva puhastusetapi kirjeldus (kui ainet puhastati);

— vähemalt kaks, parem aga kolm või enam aururõhu ja temperatuuri väärtust vahemikus 0–50 °C (või 120–150 °C);

— kui see valitud meetodi puhul on tehniliselt võimalik, peaks vähemalt üks temperatuur olema 25 °C või madalam;

— kõik originaalandmed;

— kõver log p *versus* 1/T;

— hinnanguline aururõhu väärtus 20 või 25 °C juures.

Kui esineb aine oleku muutusi (agregaatoleku muutumine, lagunemine), märgitakse järgmine teave:

— muutuse laad;

— atmosfäärirõhule vastav temperatuur, mille juures muutus toimub;

— aururõhk 10 ja 20 °C allpool olekumuutuse temperatuuri ning 10 ja 20 °C ülalpool seda temperatuuri (välja arvatud juhtum, kui agregaatolek muutub tahkest gaasiliseks).

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad andmed ja tähelepanekud, eriti sellised, mis käsitlevad lisandeid ja aine füüsikalist olekut.

3. **KIRJANDUS**

1) Official Journal of the European Communities L 383 A, 26–47 (1992).

2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.

3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

5) NF T 20–048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

6) ASTM D 2879–86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

7) NF T 20–047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use –Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼**M1**

8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521–532.

11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22–28.

13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269–278.

14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117–122.

15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137–147.

16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393–400.

17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161–168.

18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27–31.

19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300–310.

20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512–20.

21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range –25 °C to 150 °C.

22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC

▼**M1**

24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

25) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼M1

Liide

Hindamismeetod

SISSEJUHATUS

Hinnangulisi aururõhu väärtusi võib kasutada järgmistel juhtudel:

— sobiva katsemeetodi valimiseks;

— hinnangu või piirväärtuse andmiseks juhtudel, kui tehnilistel põhjustel ei saa mõõtmismeetodeid rakendada.

HINDAMISMEETOD

Vedelike ja tahkete ainete aururõhu hindamiseks võib kasutada teisendatud Watsoni korrelatsiooni (a). Ainus selleks vajalik eksperimentaalselt määratav väärtus on keemistemperatuur normaalrõhul. Meetod on rakendatav rõhuvahemikus 10^5 kuni 10^{-5} Pa.

Meetodi üksikasjalik kirjeldus on esitatud väljaandes „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (b). Vt ka OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

ARVUTUSKÄIK

Aururõhk arvutatakse järgmise valemi abil:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

kus:

T = aururõhu hindamise temperatuur,

T_b = keemistemperatuur normaalrõhul,

P_{vp} = aururõhk temperatuuril T,

ΔH_{vb} = aurustumissoojus,

ΔZ_b = kokkusurutavustegur (hinnanguliselt 0,97),

m = empiiriline konstant, mis oleneb aine füüsikalisest olekust aururõhu hindamise temperatuuril.

Kasutatakse ka valemit

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\ (8{,}75 + R \ln T_b)$$

kus K_F on aine polaarsust arvestav empiiriline tegur. Rea ühendiklasside K_F-tegurid on esitatud publikatsioonis (b).

▼**M1**

Sageli on olemas andmed keemistemperatuuri kohta madalamal rõhul. Sellisel juhul arvutatakse aururõhk järgmiselt:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_1}\right]$$

kus T_1 on keemistemperatuur madalamal rõhul P_1.

PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Kui kasutatakse hindamismeetodit, tuleb protokollis esitada täielik arvutuskäik.

KIRJANDUS

a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5. **PINDPINEVUS**

1. **MEETOD**

Kirjeldatud meetodid põhinevad OECD katsesuunisel (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viites 2.

1.1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatud meetodid on ette nähtud vesilahuste pindpinevuse mõõtmiseks.

Katse tegemiseks on kasulik teada aine lahustuvust vees, selle struktuuri, hüdrolüüsuvust ja mitsellitekke lävikontsentratsiooni.

Järgmised meetodid sobivad kohaldamiseks enamikule keemilistele ainetele, olenemata nende puhtusastmest.

Pindpinevust saab mõõta rõnga lahtirebimise meetodi abil ainult vesilahuste puhul, mille dünaamiline viskoossus on alla ca. 200 mPa s.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Pindpinevusena käsitatakse pinna vabaentalpiat pinnaühiku kohta.

Pindpinevust väljendatakse järgmistes ühikutes:

N/m (SI ühik) või

mN/m (SI alamühik)

1N/m = 103 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm (aegunud CGS-süsteemis)

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Viidetes 1 ja 3 on ära toodud laia pindpinevuste vahemikku hõlmavad võrdlusained.

1.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE

Meetodite kohaselt mõõdetakse maksimaalne jõud, mida on vaja püstsuunas rakendada mõõtenõus oleva uuritava vedeliku pinnaga kokkupuutes olevale loogale või rõngale selle lahtirebimiseks pinnalt või pinnaga kokkupuutes oleva plaadi servale tekkinud kile ülestõmbamiseks.

Aineid, mille lahustuvus vees on vähemalt 1 mg/l, analüüsitakse vesilahuses ainult ühel kontsentratsioonil.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Nende meetodite täpsus ületab tõenäolised vajadused keskkonnaohtlikkuse hindamisel.

▼B

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

Valmistatakse aine lahus destilleeritud vees. Lahuse kontsentratsioon peaks olema 90 % aine küllastuskontsentratsioonist vees; kui kontsentratsioon ületab 1 g/l, kasutatakse katses kontsentratsiooni 1 g/l. Aineid, mille lahustuvus vees on alla 1 mg/l, pole vaja testida.

1.6.1. **Plaadimeetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Loogameetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Rõngameetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **OECD ühtlustatud rõngameetod**

1.6.4.1. *Seade*

Mõõtmiseks sobivad müügil olevad tensiomeetrid. Need koosnevad järgmistest osadest:

— liikuvast proovialusest;

— dünamomeetrist;

— mõõtekehast (rõngast);

— mõõtmisnõust.

1.6.4.1.1. L i i k u v p r o o v i a l u s

Liikuvale proovialusele asetatakse uuritavat vedelikku sisaldav termostateeritud mõõtmisnõu. Alus kinnitatakse koos dünamomeetriga statiivile.

1.6.4.1.2. D ü n a m o m e e t e r

Dünamomeeter (vt joonist) paikneb proovialuse kohal. Viga jõu mõõtmisel ei tohi ületada ± 10^{-6} N, mis vastab veapiirile ± 0,1 mg massi mõõtmisel. Enamikul juhtudel on müügil olevate tensiomeetrite mõõteskaala kaliibritud mN/m skaalas, nii et pindpinevuse saab skaalalt lugeda otse millinjuutonites meetri kohta täpsusega 0,1 mN/m.

▼B

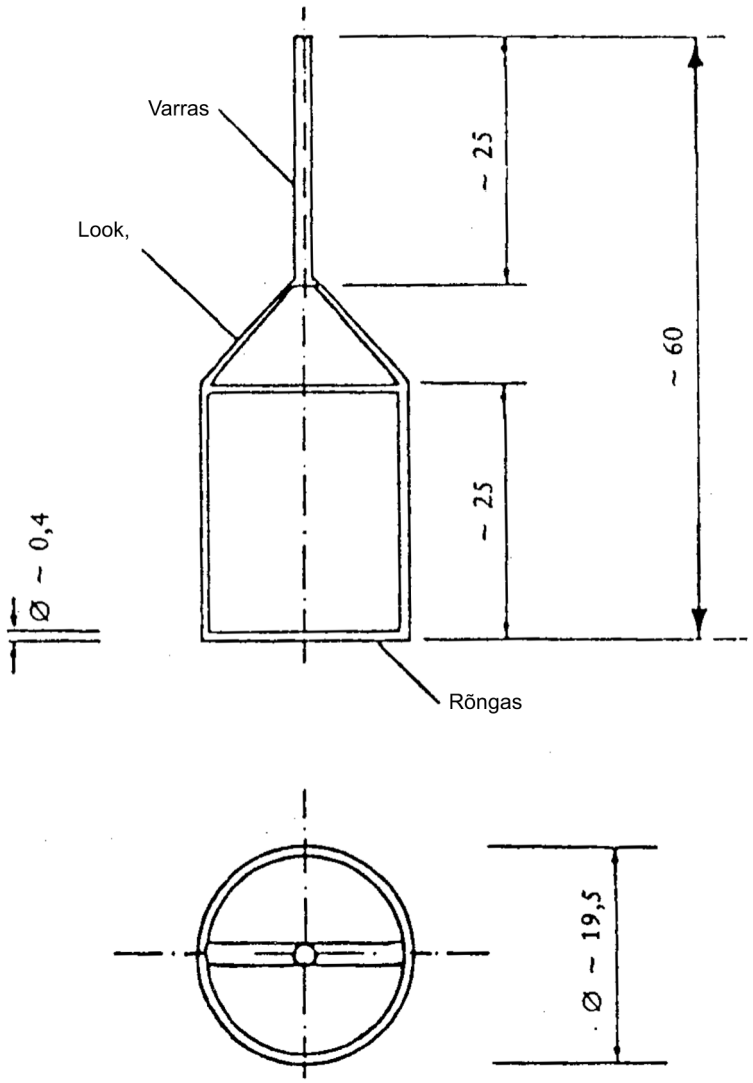
1.6.4.1.3. Mõõtekeha (rõngas)

Rõngas on tavaliselt valmistatud 0,4 mm jämedusest plaatina-iriidiumtraadist ja selle keskmine ümbermõõt on 60 mm. Rõngas ripub horisontaalselt metallvarda ja looga otsas, mille kaudu ta on ühendatud dünamomeetriga (vt joonist).

Joonis

Mõõtekeha

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



1.6.4.1.4. Mõõtmisnõu

Katselahust sisaldava mõõtmisnõuna kasutatakse termostateeritud klaasnõud. Nõu ehitus peab olema selline, et katselahuse ja selle kohal oleva gaasifaasi temperatuurid jäävad katse kestel konstantseks ning proov ei aurustu. Mõõtmisnõuks sobivad silindrilised klaasnõud sisediameetriga vähemalt 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Seadme ettevalmistamine*

1.6.4.2.1. P u h a s t a m i n e

Klaasnõud puhastatakse hoolikalt. Vajaduse korral pestakse neid kuuma kroomseguga ja seejärel kontsentreeritud fosforhappega (83–98 % H_3PO_4 (massi järgi)), loputatakse põhjalikult kraaniveega, pestakse lõpuks bidestilleeritud veega neutraalse reaktsiooni saavutamiseni ja seejärel kuivatatakse või loputatakse osaga mõõdetavast vedelikuproovist.

Rõngast loputatakse kõigepealt põhjalikult veega, et eemaldada vees lahustuvad ained, kastetakse seejärel lühikeseks ajaks kroomsegusse, pestakse siis bidestilleeritud veega neutraalse reaktsiooni saavutamiseni ja kuumutatakse lõpuks lühikest aega metanoolileegi kohal.

Märkus

Kroomsegus ja fosforhappes mittelahustuvad saasteained, nt silikoonid, eemaldatakse sobiva orgaanilise lahustiga.

1.6.4.2.2. S e a d m e k a l i i b r i m i n e

Seadme kontrollimiseks kontrollitakse nullpunkti ja reguleeritakse seda nii, et seade võimaldab täpset mõõtmist mN/m skaalas.

Kinnitus

Seade looditakse tensiomeetri aluse reguleerimiskruvide abil (näiteks alusel oleva loodinäidiku järgi).

Nullpunkti reguleerimine

Pärast rõnga kinnitamist aparaadile ja enne selle vedelikku kastmist reguleeritakse tensiomeetri näit nulli ja kontrollitakse, kas rõngas on vedeliku pinnaga paralleelne. Selleks võib vedelikupinda kasutada peeglina.

Kaliibrimised

Seadme kaliibrimiseks võib kasutada üht kahest järgmisest meetodist.

a) Raskuste abil: kasutatakse rõngale asetatavaid kindla massiga (0,1–1,0 g) raskusi. Kaliibrimistegur Φ_a, millega kõiki seadme näitusid tuleb korrutada, leitakse võrrandi 1 abil:

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

kus:

$\sigma_r = \frac{mg}{2b}$(mN/m)

m = raskuse mass (g)

g = raskuskiirendus (merepinnal 981 cm s^{-2})

b = rõnga keskmine ümbermõõt (cm)

σ_a = tensiomeetri näit pärast raskuse asetamist rõngale (mN/m).

▼B

b) Vee abil: kasutatakse puhast vett, mille pindpinevus on näiteks 23 °C juures 72,3 mN/m.

Selle meetodi kohaselt toimub kaliibrimine kiiremini kui massi abil, kuid alati eksisteerib oht, et vee pindpinevust mõjutavad pindaktiivsed lisandid. Kaliibrimistegur Φ_b, millega kõiki seadme näitusid tuleb korrutada, leitakse võrrandi 2 abil:

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

kus:

σ_o = vee pindpinevus (mN/m) kirjanduse andmetel

σ_g = mõõtmisel leitud vee pindpinevus (mN/m) mõlemad samal temperatuuril.

1.6.4.3. *Proovide ettevalmistamine*

Uuritavatest ainetest valmistatakse vajaliku kontsentratsiooniga vesilahused, kuhu ei tohi jääda lahustumatut jääki.

Lahust hoitakse püsival temperatuuril (± 0,5°C). Kuna mõõtmisnõus oleva lahuse pindpinevus muutub aja jooksul, tehakse erinevatel aegadel mitu mõõtmist ja koostatakse kõver pindpinevuse muutumise kohta ajas. Kui pindpinevus enam ei muutu, on saavutatud tasakaal.

Mõõtmistulemusi mõjutavad tolm ja gaasilised lisandid. Seetõttu tuleb katsed teha suletud kambris.

1.6.5. **Katsetingimused**

Mõõtmised tehakse ligikaudu 20 °C juures ja temperatuuri reguleeritakse ± 0,5°C täpsusega.

1.6.6. **Katse tegemine**

Mõõdetavad lahused viiakse põhjalikult puhastatud mõõtmisnõusse, vältides hoolikalt vahutamist, ja mõõtmisnõu paigutatakse katseseadmesse proovialusele. Proovialust mõõtmisnõuga tõstetakse, kuni rõngas on allpool mõõdetava lahuse pinda. Seejärel lastakse proovialust järk-järgult ühtlaselt allapoole (kiirusega ligikaudu 0,5 cm/min), eemaldades rõngast pinnast kuni maksimaalse tõmbejõu saavutamiseni. Rõnga külge kinnitunud vedelikukiht ei tohi sellest eralduda. Pärast mõõtmiste lõppu viiakse rõngas jälle allapoole vedeliku pinda ja korratakse mõõtmisi, kuni jõutakse konstantsete pindpinevuse väärtusteni. Iga mõõtmise juures registreeritakse lahuse mõõtmisnõusse viimisest möödunud aeg. Näidud võetakse rõnga vedelikupinnast lahtirebimiseks vajaliku maksimaalse jõu juures.

▼B

2. **ANDMED**

Pindpinevuse arvutamiseks tuleb seadme näit (mN/m) korrutada kaliibrimisteguriga Φ_a või Φ_b (sõltuvalt kasutatud kaliibrimismeetodist). Nii saadakse väärtus, mis on ainult ligikaudne ja vajab seega korrigeerimist.

Harkins ja Jordan (4) on empiiriliselt kindlaks määranud rõngameetodi abil määratud pindpinevuse väärtuste parandustegurid, mis sõltuvad rõnga mõõtmetest, vedeliku tihedusest ja pindpinevusest.

Kuna Harkinsi ja Jordani tabelitest iga mõõtmise jaoks eraldi parandustegurite leidmine vesilahuste pindpinevuse arvutamiseks on väga töömahukas, võib kasutada lihtsustatud meetodit, kus parandatud pindpinevuse väärtused loetakse otse tabelist. (Tabeliväärtuste vahele jäävate näitude puhul kasutatakse interpolatsiooni).

Tabel:

mõõdetud pindpinevuste parandused

Ainult vesilahuste jaoks, $\rho = 1\ g/cm^3$

R	= 9,55 mm (rõnga keskmine raadius)
r	= 0,185 mm (rõngatraadi raadius)

Katseliselt mõõdetud väärtus (mN/m)	Parandatud väärtus (mN/m)	
	Kaliibrimine raskustega (vt 1.6.4.2.2a)	Kaliibrimine veega (vt 1.6.4.2.2b)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Katseliselt mõõdetud väärtus (mN/m)	Parandatud väärtus (mN/m)	
	Kaliibrimine raskustega (vt 1.6.4.2.2a)	Kaliibrimine veega (vt 1.6.4.2.2b)
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Tabel on koostatud Harkinsi-Jordani paranduste põhjal. Tabel on sarnane DIN standardi (DIN 53914) tabeliga vee ja vesilahuste jaoks (tihedus $\rho = 1\ g/cm^3$ ja kehtib müügil olevate rõngaste kohta mõõtmetega R = 9,55 mm (rõnga keskmine raadius) ja r = 0,185 mm (rõngatraadi raadius). Tabelis on esitatud pärast raskuste või veega kaliibrimist mõõdetud pindpinevuse väärtuste ka parandatud väärtused.

Pindpinevuse võib arvutada ka ilma eelneva kaliibrimiseta, kasutades järgmist valemit:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

kus:

F = dünamomeetriga kile katkemisel mõõdetud jõud

R = rõnga raadius

f = parandustegur (1)

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— kasutatud meetodit;

— kasutatud vee või lahuse iseloomu;

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— mõõtmistulemusi: pindpinevuse väärtused, sh kõik üksiktulemused ja nende aritmeetiline keskmine ning parandatud keskmine (mis arvestab nii seadmetest tulenevat parandustegurit kui ka parandustabelit);

▼B

— lahuse kontsentratsiooni;

— katsetemperatuuri;

— lahuse vanust, st aega lahuse valmistamise ja mõõtmise vahel;

— pindpinevuse sõltuvust lahuse mõõtmisnõusse viimisest möödunud ajast;

— registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Arvestades, et destilleeritud vee pindpinevus on 20 ^{o}C juures 72,75 mN/m, tuleks ained, mille pindpinevus käesoleva meetodi abil mõõtes on alla 60 mN/m, lugeda pindaktiivseteks aineteks.

4. **VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.

3. Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

4. Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

A.6. LAHUSTUVUS VEES

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 105 (1995). Käesolev katsemeetod on 1981. aastal vastu võetud esialgse meetodi TG 105 läbivaadatud versioon. Käesoleva versiooni ja 1981. aasta versiooni vahel ei ole sisulist erinevust, muudetud on peamiselt vormi. Läbivaadatud versioon põhineb ELi katsemeetodil „Lahustuvus vees" ([1]).

LÄHTEKAALUTLUSED

2. Uuritava aine lahustuvus vees võib lisandite mõjul oluliselt muutuda. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse, kuidas määrata sellise aine lahustuvust vees, mis on praktiliselt puhas, vees püsiv ja ei lendu. Enne vees lahustuvuse määramist on kasulik omada uuritava aine kohta mõningast eelteavet, nagu struktuurvalem, aururõhk, dissotsiatsioonikonstant ja hüdrolüüs sõltuvalt pH väärtusest.

3. Käesolevas katsemeetodis on kirjeldatud kahte meetodit: kolonn-elueerimismeetod ja kolvimeetod, millega on kaetud lahustuvuse vahemikud vastavalt kuni 10^{-2} g/l ja alates kontsentratsioonist 10^{-2} g/l. Kirjeldatud on ka lihtsat eeluuringut. Eeluuringuga saab määrata uuritava proovi ligikaudse sobiva koguse, mida tuleb kasutada lõplikus katses, samuti küllastumise saavutamiseks vajaliku aja.

MÕISTED JA ÜHIKUD

4. Aine lahustuvus vees on selle küllastav massikontsentratsioon vees antud temperatuuril.

5. Lahustuvust vees väljendatakse lahustunud aine massina lahuse ruumala kohta. Lahustuvuse SI-ühik on kg/m^3; võib kasutada ka ühikut g/l.

VÕRDLUSKEMIKAALID

6. Uuritava aine lahustuvuse määramisel ei ole vaja kasutada võrdluskemikaale.

MEETODITE KIRJELDUS

Katsetingimused

7. Eelistatav katsetemperatuur on 20 ± 0,5 °C. Valitud temperatuur tuleks seadme kõigis olulistes osades hoida konstantsena.

Eeluuring

8. Astmelise meetodi kasutamisel lisatakse toatemperatuuril 10-milliliitrises klaaskorgiga mõõtesilindris üha suuremaid veekoguseid umbes 0,1 grammile uuritavale ainele (tahke uuritav aine peab olema peenestatud). Pärast iga veekoguse lisamist loksutatakse segu kümme minutit ja kontrollitakse visuaalselt lahustumata proovijääkide olemasolu. Kui proov või osa sellest

▼M4

jääb pärast 10 ml vee lisamist lahustumata, jätkatakse katset 100 ml mõõtesilindris. Ligikaudne lahustuvus on esitatud tabelis 1 lisatud vee mahulise koguse all, mille juures proov täielikult lahustub. Kui lahustuvus on väike, võib uuritava aine lahustamiseks kuluda palju aega ja katseks tuleb ette näha vähemalt 24 tundi. Kui 24 tunni möödumisel on osa uuritavast ainest ikka veel lahustumata, tuleb lahustamiseks näha ette rohkem aega (kuni 96 tundi) või kasutada suuremat lahjendust, et teha kindlaks, kas tuleb kasutada kolonn-elueerimis- või kolvimeetodit.

Tabel 1

Vee milliliitreid 0,1 g soluudi kohta	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Ligikaudne lahustuvus (g/l)	> 1 000	1 000 – 200	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Kolonn-elueerimismeetod

Põhimõte

9. Meetodi aluseks on uuritava aine veega elueerimine mikrokolonnist, mis on täidetud inertse tugimaterjaliga, mis on eelnevalt kaetud uuritava aine liiaga ([2]). Lahustuvus vees leitakse eluaadi massikontsentratsioonist, kui eluaadi kontsentratsioon jõuab teatava aja järel platoole.

Seadmed

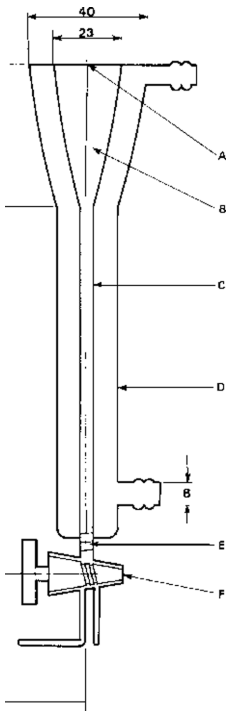
10. Seadmestik koosneb mikrokolonnist (joonis 1), mida hoitakse konstantse temperatuuri juures. Mikrokolonn on ühendatud kas tsirkulatsioonpumbaga (joonis 2) või ühtlustava anumaga (joonis 3). Mikrokolonn sisaldab inertset kandjat, mida hoiab paigal väike klaasvatikork, mis toimib ühtlasi ka osakeste filtrina. Võimalikud inertse kandjana kasutatavad materjalid on klaashelmed, diatomiit või muud inertsed materjalid.

11. Joonisel 1 kujutatud mikrokolonn sobib töötamiseks koos tsirkulatsioonpumbaga. Kolonnil on tühi ülaosa, mille maht on viis statsionaarse faasi mahtu (mis visatakse ära eksperimendi alguses) ja viis proovi ruumala (mis võetakse analüüsimiseks katse käigus). Seda vaba ruumi võib ka vähendada, kui lisandite kõrvaldamiseks kasutatava viie statsionaarse faasi mahu eluaadi asemele saab katse ajal lisada süsteemi vett. Kolonn on inertsest materjalist toru abil ühendatud tsirkulatsioonpumbaga, mille pumpamiskiirus on ligikaudu 25 ml/h. Tsirkulatsioonpump võib olla näiteks peristaltiline või membraanpump. Tuleb jälgida, et toru materjal ei põhjustaks saastumist ega adsorptsiooni.

12. Joonisel 3 on skemaatiliselt kujutatud tüüpiline ühtlustava anumaga süsteem. Selles süsteemis on mikrokolonn varustatud ühekäigukraaniga. Ühendamiseks ühtlustava anumaga on kasutatud klaaslihvühendust ja inertsest materjalist valmistatud voolikut. Lahuse ühtlustavast anumast välja voolamise kiirus peaks olema ligikaudu 25 ml/h.

▼**M4**

Joonis 1



Mõõtmed millimeetrites

A. Lihvmuhv lihvühenduse jaoks

B. Vaba ruum kolonni peas

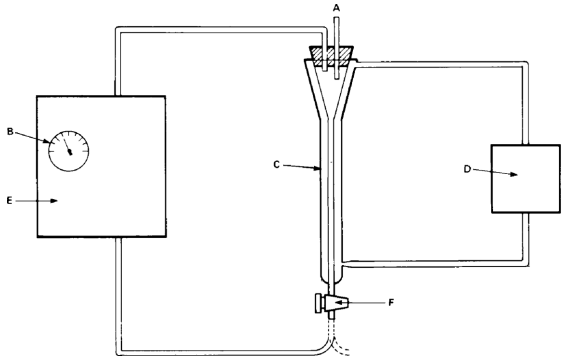
C. Sisediameeter 5 mm

D. Välisdiameeter 19 mm

E. Klaasvatist kork

F. Kraan

Joonis 2



A. Tasakaalustamine atmosfäärirõhuga

B. Voolumõõtur

C. Mikrokolonn

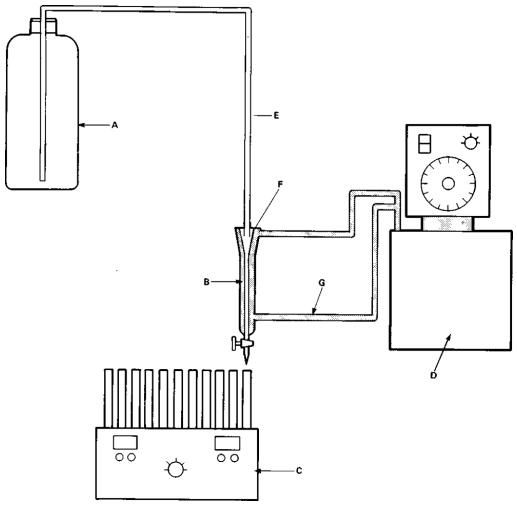
D. Termostateeritud tsirkulatsioonpump

E. Tsirkulatsioonpump

F. Kahekäigukraan proovide võtmiseks

▼**M4**

Joonis 3



A. Ühtlustav anum (nt 2,5 l kolb)

B. Kolonn

C. Fraktsioonikoguja

D. Termostaat

E. Teflonvoolik

F. Klaaslihvühendus

G. Veevoolik termostaadi ja kolonni vahel (sisediameeter ligikaudu 8 mm)

13. Ligikaudu 600 mg tugimaterjali kantakse 50 ml ümarkolbi. Sobiv kogus uuritavat ainet lahustatakse kergesti lenduvas analüüsireaktiivi puhtusklassiga lahustis ja sobiv kogus seda lahust lisatakse tugimaterjalile. Selleks et vältida jaotumist tugiaine pinnal ja saavutada elueerimisetapil tugiaine küllastumine veega, eemaldatakse lahusti täielikult, näiteks pöördaurusti kasutamisega. Kaetud tugimaterjali lastakse kaks tundi seista ligikaudu 5 ml vees ja seejärel viiakse suspensioon mikrokolonni. Teise võimalusena võib kuiva kaetud tugimaterjali kallata veega täidetud mikrokolonni ja lasta sel kaks tundi tasakaalustuda.

14. Tugimaterjali katmine uuritava ainega võib tekitada probleeme, mille tõttu saadakse valed tulemused, näiteks kui uuritav aine sadestub tugiainele õlina. Selliseid probleeme tuleks uurida ja katseprotokollis tuleks esitada üksikasjad.

Mõõtmine tsirkulatsioonpumba kasutamisega

15. Kolonni hakatakse voolutama. Soovitatav on kasutada ligikaudset voolukiirust 25 ml/h, mis kirjeldatud kolonni puhul tähendab kümmet kolonni statsionaarse faasi mahtu tunnis. Vähemalt esimesed viis statsionaarse faasi mahtu visatakse ära, et eemaldada voolutamisega vees lahustuvad lisandid. Seejärel lastakse tsirkulatsioonpumbal töötada tasakaalu saabumiseni, st senikaua, kuni viie järjestikuse proovi kontsentratsioonide erinevused on juhuslikud ega ületa ±30 %. Nende proovide vahelised ajavahemikud peaksid vastama ajale, mis kulub vähemalt kümne statsionaarse faasi mahu eluendi voolamiseks läbi kolonni. Analüüsimeetodist olenevalt võib olla parem koostada graafik kontsentratsiooni sõltuvuse kohta ajast, millelt on näha tasakaalu saabumist.

▼M4

Määramine ühtlustava anuma kasutamisega

16. Tuleks koguda järjestikuseid eluaadifraktsioone ja analüüsida neid valitud meetodi abil. Aine lahustuvus vees määratakse eluaadi keskjooksust nende fraktsioonide põhjal, mille kontsentratsioonid jäävad vähemalt viie järjestikuse proovi kestel konstantseks ((±30 %).

17. Eelistatud voolutuskeskkond on bidestilleeritud vesi. Kasutada võib ka deioniseeritud vett, mille takistus on üle 10 megaoomi/cm ja orgaanilise süsiniku sisaldus alla 0,01 %.

18. Kummagi meetodi puhul tehakse teine voolutamine poole väiksema voolukiirusega kui esimene. Kui kahe voolutamise tulemused on kooskõlas, on katse tehtud rahuldavalt. Kui väiksema voolukiiruse juures on mõõdetud lahustuvus suurem, tuleb voolukiiruse poole võrra vähendamist jätkata seni, kui kahe järjestikuse voolutamisega saadakse ühesugune lahustuvus.

19. Mõlema meetodi puhul tuleb Tyndalli efekti kasutamisega kontrollida, et fraktsioonid ei sisaldaks kolloidset ainet. Kolloidosakeste olemasolu korral katse tulemusi ei arvestata ja katset korratakse kolonniga, mille filtrivad omadused on paremad.

20. Tuleb mõõta iga proovi pH, eelistatult spetsiaalse indikaatorpabeririba abil.

Kolvimeetod

Põhimõte

21. Aine (tahke aine peab olema peenestatud) lahustatakse vees katsetemperatuurist mõnevõrra kõrgemal temperatuuril. Küllastumise saavutamisel segu jahutatakse ja hoitakse katsetemperatuuril. Mõõtmist võib alustada ka kohe katsetemperatuuril, kui sobivate proovide võtmisega on näidatud, et küllastustasakaal on saavutatud. Seejärel määratakse sobiva analüüsimeetodi (3) abil aine massikontsentratsioon vesilahuses, mis ei tohi sisaldada lahustumata osakesi.

Seadmed

22. Vaja on järgmisi materjale:

— tavalised labori klaasnõud ja seadmed;

— seade lahuse segamiseks konstantsel termostaaditemperatuuril;

— emulsiooni korral võib vaja minna tsentrifuugi (eelistatult termostateeritud), ning

— analüüsiseadmed.

Katse läbiviimise kord

23. Soovitud ruumala vee küllastamiseks vajalik uuritava aine kogus hinnatakse eeluuringu abil. Võetakse kolm klaaskorgiga klaasnõu (nt tsentrifuugiklaasid või kolvid) ja kaalutakse igaühte umbes viiekordne eespool osutatud ainekogus. Igasse nõusse lisatakse teatav kogus vett; veekogus valitakse vastavalt analüüsimeetodile ja lahustuvuse vahemikule. Nõud suletakse tihedalt korgiga ja seejärel segatakse temperatuuril 30 °C. Kasutada tuleks konstantsel temperatuuril töötavat loksutit või segajat, nt magnetsegajat termostateeritud veevanniga. Ühe päeva pärast võetakse üks nõu ja tasakaalustatakse seda 24 h katsetemperatuuril aeg-ajalt loksutades. Nõu sisu tsentrifuugitakse seejärel katsetemperatuuril ja määratakse siis sobiva analüüsimeetodi

▼M4

abil uuritava aine kontsentratsioon selges veefaasis. Sama korratakse ülejäänud kahe nõuga vastavalt kahe- ja kolmepäevase 30 °C juures eelneva tasakaalustamise järel. Kui vähemalt kahes viimases nõus määratud kontsentratsioonid ei erine rohkem kui 15 %, on katse tehtud rahuldavalt. Kui esimese, teise ja kolmanda nõu mõõtmisel saadud tulemustes ilmneb kasvutendents, tuleb katset korrata pikemate tasakaalustamisaegadega.

24. Katse võib teha ka ilma eelneva inkubeerimiseta 30 °C juures. Küllastumistasakaalu saavutamise kiiruse hindamiseks võetakse proove senikaua, kuni mõõdetav kontsentratsioon enam ei sõltu segamise ajast.

25. Tuleb mõõta iga proovi pH, eelistatult spetsiaalse indikaatorpabeririba abil.

Analüütilised määramised

26. Määramisel eelistatakse spetsiifilisi uuritava aine määramise meetodeid, kuna juba väike lisandikogus võib mõõdetud lahustuvuse väärtuses põhjustada suure vea. Sellised meetodid on näiteks gaas- või vedelikkromatograafia, tiitrimine, fotomeetria, voltameetria.

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

Kolonn-elueerimismeetod

27. Iga katse puhul tuleks välja arvutada vähemalt viie järjestikuse küllastusplatool võetud proovi keskmine väärtus ja standardhälve. Eri voolukiiruste juures tehtud kahe katse keskmised väärtused ei tohiks erineda rohkem kui 30 %.

Kolvimeetod

28. Kolme kolvi määramisel saadud üksiktulemused, mis ei tohiks erineda üle 15 %, keskmistatakse.

Katseprotokoll

Kolonn-elueerimismeetod

29. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

— eeluuringu tulemused;

— aine keemiline määratlus ja lisandid (eelnevad puhastamisetapid, kui ainet puhastati);

— iga proovi kontsentratsioon, voolukiirus ja pH;

— iga katse kohta vähemalt viie küllastusplatool võetud proovi keskväärtus ja standardhälve;

— vähemalt kahe järjestikuse katse keskmine väärtus;

— vee temperatuur küllastamise ajal;

— analüüsimeetod;

— kasutatud tugimaterjal;

— tugimaterjali katmisega seotud andmed;

— kasutatud lahusti;

— andmed aine mis tahes keemilise ebastabiilsuse kohta katse tingimustes;

— kogu muu asjakohane teave, eriti lisandite ja aine füüsikalise oleku kohta, mis võib mõjutada tulemuste tõlgendamist.

▼**M4**

Kolvimeetod

30. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

— eeluuringu tulemused;

— aine keemiline määratlus ja lisandid (eelnevad puhastamisetapid, kui ainet puhastati);

— iga üksiku analüüsi tulemus ja tulemuste keskmine, kui ühe kolvi kohta tehti mitu mõõtmist;

— iga proovi pH väärtus;

— eri kolbidega saadud kooskõlaliste tulemuste keskväärtused;

— katsetemperatuur;

— analüüsimeetod;

— andmed aine mis tahes keemilise ebastabiilsuse kohta katse tingimustes;

— kogu muu asjakohane teave, eriti lisandite ja aine füüsikalise oleku kohta, mis võib mõjutada tulemuste tõlgendamist.

KIRJANDUS

1) Komisjoni direktiiv 92/69/EMÜ, 31. juuli 1992, millega seitsmeteistkümnendat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta (EÜT L 383, 29.12.1992, lk 113).

2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

▼B

A.8. **JAOTUSTEGUR**

1. **MEETOD**

Kirjeldatud „loksutamismeetod” põhineb OECD katsesuunisel (1).

1.1. SISSEJUHATUS

Katse tegemiseks on kasulik teada aine struktuuri ja dissotsiatsioonikonstanti, lahustuvust vees, hüdrolüüsuvust, lahustuvust oktanoolis ja pindpinevust.

Sooli moodustavate ainete puhul tuleks mõõtmisi teha ainult vabas olekus ainega (vabal happel või vabal alusel), mis saadakse sobiva puhverlahuse kasutamisel pH-ga vähemalt ühe ühiku võrra alla (vaba happe saamiseks) või üle (vaba aluse saamiseks) vastava pK.

Katsemeetod sisaldab kaht eraldi protseduuri: loksutamismeetodit ja kõrge eraldusvõimega vedelikkromatograafiat (HPLC). Esimest meetodit kasutatakse ainetel log P_{ow} (mõisteid vt allpool) väärtusega vahemikus –2 kuni 4, viimast ainetel log P_{ow} väärtusega vahemikus 0 kuni 6. Enne kummagi katseprotseduuri rakendamist tuleks varem kindlaks teha jaotusteguri hinnanguline väärtus.

Loksutamismeetodit saab kasutada ainult puhaste, vees ja oktanoolis lahustuvate ainete puhul. Seda ei saa kasutada pindaktiivsete ainete korral (viimaste puhul tuleks esitada arvutuslikult leitud väärtus või hinnanguline väärtus, mis on leitud üksikute lahustuvuste põhjal oktanoolis ja vees).

HPLC meetodit ei saa kasutada tugevate hapete ega aluste, metallikomplekside, pindaktiivsete ainete ega eluendiga reageerivate ainete puhul. Nende ainete korral tuleks esitada arvutuslikult leitud väärtus või hinnanguline väärtus, mis on leitud üksikute lahustuvuste põhjal oktanoolis ja vees).

HPLC meetod on katseühendis olevate lisandite suhtes vähem tundlik kui loksutamismeetod. Sellele vaatamata võivad lisandid tulemuste tõlgendamise keeruliseks muuta, kuna piike ei saa enam kindlalt identifitseerida. Eristamatute piikidega segude puhul tuleks esitada log P ülemine ja alumine piir.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Jaotustegur (P) on määratletud lahustunud aine tasakaalukontsentratsioonide (c_i) suhtena kahest praktiliselt segunematust lahustist koosnevas kahefaasilises süsteemis. Oktanooli ja vee puhul:

$$P_{ow} = \frac{c_n - \text{oktanool}}{c_{\text{wessi}}}$$

Jaotustegur (P) on seega kahe kontsentratsiooni suhe ja seda väljendatakse harilikult kümnendlogaritmina (log P).

▼B

1.3. VÕRDLUSAINED

Loksutamismeetod

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

HPLC meetod

Ühendi HPLC mõõtmistulemuste ja tema P väärtuse vastavuse leidmiseks tuleb koostada vähemalt kuue punktiga kaliibrimiskõver telgedes log P *vs.* HPLC mõõtmistulemused. Sobivad võrdlusained peab valima analüüsi sooritaja. Võimaluse korral peaks üks võrdlusühend olema testainest kõrgema ja üks madalama P_{OW} väärtusega. Log P väärtustel alla 4 piisab kaliibrimiseks loksutamismeetodil saadud andmetest. Log P väärtustel üle 4 võib kaliibrimiseks kasutada kirjanduses esitatud andmeid, kui need on kooskõlas arvutuslikult leitud väärtustega. Suurema täpsuse huvides on eelistatav kasutada testainele struktuuriliselt lähedasi võrdlusühendeid.

Kirjandusest on paljude ainerühmade kohta võimalik leida ulatuslikke andmekogumeid log P_{OW} väärtustega (2, 3). Kui samalaadse struktuuriga ühendite jaotustegurite kohta andmed puuduvad, võib kasutada vähem spetsiifilist kaliibrimist muude võrdlusühenditega.

Liites 2 esitatakse soovitatavate võrdlusainete ja nende P_{OW} väärtuste nimekiri.

1.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE

1.4.1. **Loksutamismeetod**

Jaotusteguri määramiseks tuleb saavutada kõigi süsteemi vastastiktoimes olevate komponentide tasakaal ja määrata siis kummaski faasis lahustunud ainete kontsentratsioonid. Selleteemalise kirjanduse põhjal on selleks võimalik kasutada mitmeid erinevaid meetodeid; nt kaks faasi segatakse põhjalikult ja eraldatakse seejärel uuritava aine tasakaalukontsentratsiooni määramiseks.

1.4.2. **HPLC meetod**

HPLC jaoks kasutatakse müügil olevaid analüütilisi kolonne, mille täidiseks on pikkade (nt C_8, C_{18}) silikageeliga seotud süsivesinikahelatega tahke faas. Seesugusesse kolonni süstitud kemikaalid liiguvad selles erinevate kiirustega, kuna jaotuvad liikuva faasi ja statsionaarse süsivesinikfaasi vahel erinevalt. Kemikaalide segud elueeruvad oma hüdrofoobsuse järjekorras – vees lahustuvad kemikaalid elueeruvad esimesena ja rasvlahustuvad viimasena, olenevalt oma süsivesiniku-vee jaotustegurist. Nii on retentsiooniaega sellises (pöördfaasilises) kolonnis võimalik seostada oktanooli/vee jaotusteguriga. Jaotustegur leitakse mahtuvustegurist k, mille valem on järgmine:

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

kus t_r = testaine retentsiooniaeg ja t_0 = keskmine aeg, mille jooksul lahustimolekul läbib kolonni (surnud aeg).

Kvantitatiivne analüüs pole vajalik, määrata tuleb ainult retentsiooniajad.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

1.5.1. **Korratavus**

Loksutamismeetod

Leitava jaotusteguri täpsuse tagamiseks tehakse kordusmõõtmised kolmedel erinevatel katsetingimustel, erineva ainekoguse ja erineva lahustite mahu suhtega. Korduskatsetel määratud jaotusteguri väärtused peaksid logaritmina väljendatuna ± 0,3 ühiku täpsusega kokku langema.

HPLC meetod

Mõõtmistulemuste usaldusväärsuse parandamiseks tuleks teha kordusmõõtmised. Üksikutel mõõtmistel määratud log P väärtused peaksid ± 0,1 ühiku täpsusega kokku langema.

1.5.2. **Tundlikkus**

Loksutamismeetod

Meetodi mõõtepiirkonna määrab kasutatava analüüsimeetodi avastamispiir. See peaks võimaldama määrata log P_{OW} väärtused vahemikus –2 kuni 4 (mõningatel tingimustel võib ülemist piiri nihutada kuni log P_{OW} väärtuseni 5) eeldusel, et lahustunud aine kontsentratsioon kummaski faasis ei ületa 0,01 mooli liitris.

HPLC meetod

HPLC meetod võimaldab määrata jaotusteguri log P_{OW} vahemikus 0–6.

Üldjuhul langeb selle meetodi abil määratud jaotusteguri logaritmiline väärtus ± 1 ühiku täpsusega kokku loksutamismeetodi abil leitud väärtusega. Tüüpilisi vastavusi võib leida kirjandusest (4, 5, 6, 7, 8). Suurem täpsus on tavaliselt saavutatav samalaadse struktuuriga võrdlusühendite kasutamisel (9).

▼B

1.5.3. **Spetsiifilisus**

Loksutamismeetod

Nernsti jaotusseadus kehtib ainult konstantsel temperatuuril, rõhul ja pH-l ning ainult lahjendatud lahustes. See kehtib ainult puhta, kahe puhta lahusti vahel dispergeeritud aine puhul. Kui ühes või mõlemas faasis on samal ajal mitu lahustunud ainet, võib see tulemusi mõjutada.

Lahustunud molekulide dissotsieerumise või assotsieerumisega kaasnevad samuti kõrvalekalded Nernsti jaotusseadusest. Kõrvalekalded väljenduvad sõltuvuse tekkes jaotusteguri ja lahuse kontsentratsiooni vahel.

Paljude tulemust mõjutavate tasakaalude tõttu ei tohiks seda katsemeetodit dissotsieeruvatel ühenditel vastava paranduseta kasutada. Selliste ühendite puhul tuleks kaaluda puhverlahuse kasutamist vee asemel; puhvri pH peaks vähemalt ühe ühiku võrra erinema aine pKa väärtusest ja arvesse tuleks võtta selle pH mõju antud keskkonnale.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Jaotusteguri esialgne hindamine**

Jaotustegurit on eelistatav hinnata arvutuslikult (vt liidet 1) või testaine lahustuvuse suhte põhjal puhastes lahustites (10).

1.6.2. **Loksutamismeetod**

1.6.2.1. *Lahustite ettevalmistamine*

Oktanool: jaotusteguri määramisel tuleks kasutada analüüsipuhast lahustit.

Vesi: kasutada tuleks vett, mis on bidestilleeritud klaas- või kvartsseadmes. Dissotsieeruvate ühendite puhul tuleks vee asemel kasutada puhverlahuseid, juhul kui see on õigustatud.

Märkus

Otse ioonvahetist pärinevat vett kasutada ei tohi.

1.6.2.1.1. Lahustite eelküllastamine

Enne jaotustegur määramist tuleks lahustitesüsteemi faasid katsetemperatuuril loksutades üksteise suhtes küllastada. Praktiline lahendus selleks on panna analüüsipuhas oktanool ja vesi kumbki suures pudelis piisava koguse teise lahustiga 24 tunniks mehaanilisele loksutile ja lasta neil seejärel seista faaside eraldumise ja küllastumiseni.

▼B

1.6.2.1.2. Katseks valmistumine

Kahefaasilise süsteemi kogumaht peaks katseanuma peaaegu täielikult täitma. See aitab vältida kadusid lendumise kaudu. Kasutatavate mahtude suhe ja ainekogused sõltuvad järgmistest asjaoludest:

— esialgsest hinnangulisest jaotusteguri väärtusest (vt eespool);

— analüüsiks vajalikust minimaalsest testaine kogusest ning

— kontsentratsioonipiirangust 0,01 mol/l kummaski faasis.

Sooritatakse kolm katset. Esimeses kasutatakse arvutatud oktanooli-vee suhet, teises jagatakse see suhe kahega ja kolmandas korrutatakse see suhe kahega (nt 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Testaine

Valmistatakse põhilahus veega eelküllastatud oktanoolis. Põhilahuse kontsentratsioon tuleks enne selle jaotusteguri mõõtmisel kasutamist täpselt kindlaks määrata. Lahust tuleks säilitada tingimustes, mis tagavad selle stabiilsuse.

1.6.2.2. *Katsetingimused*

Katsetemperatuuri tuleks hoida konstantsena (± 1 °C) ja see peaks jääma vahemikku 20–25 °C.

1.6.2.3. *Mõõtmisprotseduur*

1.6.2.3.1. Jaotustasakaalu saavutamine

Kõigi katsetingimuste jaoks tuleks kahes eksemplaris ette valmistada vajalikud mõlema lahusti kaalutised koos vajaliku koguse põhilahusega.

Oktanoolifaase tuleks mõõta mahu järgi. Katseanumaid tuleks loksutada kas sobival loksutil või käsitsi. Tsentrifuugiklaasi kasutamisel on seda soovitatav kiiresti 180° ümber oma risttelje pöörata, nii et sissejäänud õhk tõuseb läbi mõlema faasi. Kogemused on näidanud, et tavaliselt piisab jaotustasakaalu saavutamiseks 50 sellisest pöördest. Kindluse mõttes on soovitatav rakendada 100 pööret viie minuti jooksul.

1.6.2.3.2. Faaside eraldamine

Vajaduse korral tuleks segu faaside eraldamiseks tsentrifuugida. Seda tuleks teha toatemperatuuril hoitavas laboritsentrifuugis; mittetermostateeritava tsentrifuugi kasutamisel tuleks tsentrifuugiküvette enne analüüsi vähemalt tund aega tasakaalustada.

▼B

1.6.2.4. *Analüüs*

Jaotusteguri määramiseks tuleb määrata testaine kontsentratsioonid mõlemas faasis. Selleks võib võtta kindla koguse lahust iga katsenõu mõlemast faasist ja analüüsida neid vastavalt valitud meetodile. Arvutada tuleks mõlemas faasis oleva aine koguhulka ja võrrelda seda alguses süsteemi viidud kogusega.

Proovide võtmisel veefaasist tuleks kasutada meetodit, mille puhul oktanoolifaasi jälgede proovi sattumise oht on minimaalne, näiteks klaassüstlalt eemaldatava nõelaga. Süstal peaks algul olema osaliselt õhuga täidetud. Nõela viimisel läbi oktanoolikihi tuleks õhk õrnalt välja suruda. Küllaldane kogus veefaasi tõmmatakse süstlasse. Süstal tõmmatakse kiirelt lahusest välja ja nõel eemaldatakse. Süstla sisu võib seejärel veefaasi proovina kasutada. Kontsentratsioonid eraldatud faasides tuleks eelistatavalt määrata spetsiifiliste määramismeetodite abil. Sobida võivad näiteks järgmised analüüsimeetodid:

— fotomeetrilised meetodid;

— gaaskromatograafia;

— kõrge eraldusvõimega vedelikkromatograafia.

1.6.3. **HPLC meetod**

1.6.3.1. *Ettevalmistused*

Seade

Vajalik on pulseerimisvaba pumba ja sobiva detektoriga vedelikkromatograaf. Soovitatav on kasutada silmusega sisestamisklappi. Polaarsete rühmade esinemine statsionaarses faasis võib HPLC kolonni efektiivsust oluliselt vähendada. Seetõttu peaks polaarsete rühmade sisaldus statsionaarses faasis olema minimaalne (11). Kasutada võib müügil olevaid mikrogranulaarseid pöördfaasilisi täidiseid või valmiskolonne. Sisestamissüsteemi ja analüüsikolonni vahel võib olla kaitsekolonn.

Liikuvfaas

Elueerimislahusti valmistatakse HPLC-puhtast metanoolist ja HPLC-puhtast veest ning see degaseeritakse enne kasutamist. Kasutada tuleks isokraatilist elueerimist. Veesisaldus metanooli-vee liikuvfaasides peaks olema vähemalt 25 %. Tavaliselt piisab ühendite, mille log P = 6, elueerimiseks ühe tunni jooksul 1 ml/min voolukiiruse juures metanooli-vee suhtest 3:1 (mahu järgi). Kõrge log P-ga ühendite (ja võrdlusühendite) puhul võib olla vaja retentsiooniaega lühendada, vähendades selleks liikuva faasi polaarsust või kolonni pikkust.

Oktanoolis väga madala lahustuvusega ühenditel kaldub HPLC meetodi kohaselt leitud log P_{OW} väärtus olema ebaharilikult madal; selliste ühendite piigid elueeruvad vahel koos lahusti frondiga. See on tõenäoliselt tingitud asjaolust, et jaotumisprotsess on liiga aeglane, saavutamaks normaalse kestusega HPLC eraldamise jooksul tasakaalu. Usaldusväärse väärtuse saamiseks võib sellisel juhul abi olla voolukiiruse vähendamisest ja/või metanooli-vee suhte alandamisest.

▼B

Katse- ja võrdlusühendite lahustuvus liikuvas faasis peab olema küllaldane nende tuvastamiseks. Metanooli-vee segus võib lisandeid kasutada ainult erandjuhtudel, kuna lisandid muudavad kolonni omadusi. Lisanditega kromatogrammide tegemisel tuleb kasutada teist sama tüüpi kolonni. Kui metanooli-vee eluent ei sobi, võib kasutada muid orgaanilise lahusti ja vee segusid, nt etanooli-vee või atsetonitriili-vee segu.

Dissotsieeruvate ühendite puhul on eluendi pH kriitilise tähtsusega. See peaks jääma kolonni töövahemikku, mis on tavaliselt 2–8. Soovitatav on kasutada puhverlahust. Hoolikalt tuleks vältida soolade sadestumist ja kolonni omaduste halvenemist, mida tuleb ette mõningate orgaanilise faasi/puhverlahuse segude puhul. HPLC määramisi ei ole silikageelil põhinevate statsionaarsete faasidega pH väärtustel üle 8 soovitatav teha, kuna aluseline liikuv faas võib kolonni omadusi järsult halvendada.

Lahustunud ained

Võrdlusühendid peaksid olema võimalikult kõrge puhtusastmega. Uuritavad ja kaliibrimisel kasutatavad ühendid lahustatakse võimaluse korral liikuvas faasis.

Katsetingimused

Temperatuur ei tohiks mõõtmiste käigus kõikuda rohkem kui ± 2 K.

1.6.3.2. **Mõõtmine**

Surnud aja t_0 arvutamine

Surnud aega t_0 võib määrata kas homoloogilise rea (nt alküülmetüülketoonid) või kolonnis mittepeetuvate orgaaniliste ühendite (nt tiouurea, formamiid) abil. Surnud aja arvutamiseks homoloogilise rea abil süstitakse kolonni vähemalt seitse homoloogilise rea liiget ja määratakse vastavad retentsiooniajad. Töötlemata retentsiooniaja väärtused $t_{r\ (n\ c\ +\ 1)}$ esitatakse $t_{r\ (n\ c)}$ funktsioonina ja leitakse järgmise regressioonivõrrandi lõikepunkt a ja tõus b:

$$t_{r_{(nc\ +\ 1)}} = a + b\ t_{r_{(nc)}}$$

(n_c = süsinikuaatomite arv). Surnud aeg t_0 leitakse seejärel järgmisest valemist:

$$t_0 = a/(1-b)$$

▼B

Kaliibrimisgraafik

Järgmise etapina koostatakse sobivate võrdlusühendite log k *versus* log P korrelatsioonikõver. Praktikas süstitakse ühel ajal 5–10 võrdlusühendit, mille log P jääb eeldatavasse log P vahemikku, ja määratakse retentsiooniajad, eelistatavalt detektorsüsteemiga ühendatud meerikuga integraatori abil. Arvutatakse vastavad logaritmilised mahtuvustegurite väärtused log k ja esitatakse graafiliselt nende sõltuvus loksutamismeetodil leitud log P väärtustest. Kaliibrimine tehakse regulaarsete ajavahemike tagant, vähemalt kord päevas, et võtta arvesse võimalikke kolonni efektiivsuse muutusi.

Testaine mahtuvusteguri määramine

Testaine süstitakse võimalikult väikese liikuvfaasi kogusega. Määratakse retentsiooniaeg (soovitatavalt kahe paralleelmääramisena), võimaldades nii arvutada mahtuvustegurit k. Seejärel saab võrdlusühendite korrelatsioonigraafiku põhjal interpoleerida testaine jaotusteguri. Väga kõrgete ja väga madalate jaotustegurite korral tuleb väärtus ekstrapoleerida. Sellisel juhul tuleb hoolikalt silmas pidada regressioonisirge usalduspiiri.

2. **ANDMED**

Loksutamismeetod

Määratud log P väärtuste usaldatavust saab kontrollida topeltmääramiste tulemuste keskmise võrdlemisel üldise keskmisega.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— kui kumbki meetod ei ole kohaldatav (nt pindaktiivsete ainete puhul), tuleks esitada arvutuslikult leitud väärtus või hinnanguline väärtus, mis on leitud üksikute lahustuvuste põhjal oktanoolis ja vees);

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmeid ja märkusi.

Loksutamismeetodi puhul:

— esialgse hinnangulise määramise tulemust, kui see leiti;

— määramistemperatuuri;

— kontsentratsioonide määramisel kasutatud analüüsiprotseduuride andmeid;

— tsentrifuugimise kestust ja kiirust, kui seda kasutati;

▼B

— mõlemas faasis igal määramisel leitud kontsentratsioone (st kokku 12 kontsentratsiooni väärtust);

— testaine massi, mõlema faasi mahtu igas katseanumas ja pärast tasakaalustamist kummaski faasis oleva testaine summaarset arvutuslikku kogust;

— iga katsetingimuste kogumi kohta tuleks esitada jaotusteguri (P) arvutuslikult leitud väärtused ning nende keskmine, samuti kõigi määramiste keskmine. Kui on märke jaotusteguri kontsentratsioonisõltuvusest, tuleks see aruandes ära märkida;

— esitada tuleks üksikute P väärtuste standardhälve nende keskväärtusest;

— kõigi määramiste keskmine P väärtus tuleks esitada ka kümnendlogaritmina;

— arvutuslikku teoreetilist P_{OW} väärtust, kui selline väärtus määrati või kui mõõdetud väärtus on suurem kui 10^4;

— katses kasutatud vee ja veefaasi pH-d;

— puhvrite kasutamisel nende vee asemel kasutamise põhjendust, nende koostist, kontsentratsiooni ja pH väärtust ning veefaasi pH väärtust enne ja pärast katset.

HPLC meetodi puhul:

— esialgse hinnangulise määramise tulemust, kui see leiti;

— test- ja võrdlusaineid ja nende puhtust;

— määramiste temperatuurivahemikku;

— pH-d, mille juures määramised tehti;

— andmeid analüüsi- ja kaitsekolonni, liikuva faasi ja kasutatud detektori kohta;

— kaliibrimisel kasutatud võrdlusühendite retentsiooniandmeid ja kirjanduses esitatud log P väärtusi;

— sobitatud regressioonisirge (log k *versus* log P) andmeid;

— katseühendi keskmisi retentsiooniandmeid ja interpoleeritud log P väärtust;

— seadmete ja töötingimuste kirjeldust;

— elueerimisprofiile;

— kolonni viidud test- ja võrdlusainete koguseid;

— surnud aega ja selle määramise meetodit.

▼B

4. **VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.

3. Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) – Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

4. L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

5. H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).

6. B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

7. W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

8. J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

9. S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

10. O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.

11. R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

12. A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

13. R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

14. NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.

15. C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1 459.

16. A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

17. C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16,1 207.

18. W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1 113.

19. D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

20. J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼B

21. R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984,

22. Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.

23. N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

1. liide

Arvutus-/hindamismeetodid

SISSEJUHATUS

Üldise arvutusmeetodite tutvustuse, vastavaid andmeid ja näiteid võib leida raamatust „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (a).

Arvutuslikke P_{OW} väärtusi saab kasutada

— sobiva katsemeetodi valikul (loksutamismeetod: log P_{OW} vahemikus –2 kuni 4, HPLC meetod: log P_{OW} vahemikus 0–6);

— sobivate katsetingimuste valikul (näiteks võrdlusainete valikul HPLC protseduurideks, oktanooli/vee suhte valikul loksutamismeetodi puhul);

— labori sisekontrollimeetodina võimalike katsevigade avastamiseks;

— hinnangulise P_{OW} väärtuse saamiseks juhtudel, mille puhul katsemeetodeid tehnilistel põhjustel rakendada ei saa.

HINDAMISMEETOD

Jaotusteguri esialgne hindamine Jaotusteguri hinnangulise väärtuse võib leida testaine lahustuvuse põhjal puhastes lahustites.

Selleks:

$$P_{estimate} = \frac{\text{saturation } C_{n\,-\,Octanol}}{\text{saturation } C_{water}}$$

ARVUTUSMEETODID

Arvutusmeetodite põhimõte

Kõigi arvutusmeetodite kohaselt jagatakse molekul sobivateks alamstruktuurideks, mille kohta on olemas usaldusväärsed log P_{OW} osaväärtused. Seejärel arvutatakse terve molekuli log P_{OW}, liites kokku funktsionaalrühmadele vastavad osaväärtused ja sisemolekulaarseid vastasmõjusid arvestavad parandusliikmed.

Rühmakonstantide ja parandusliikmete väärtusi võib leida toodud allikatest (b, c, d, e). Mõnda allikat ajakohastatakse regulaarselt (b).

Kvaliteedinõuded

Üldjuhul arvutusmeetodi usaldusväärsus väheneb uuritava ühendi keerukuse kasvades. Madala molaarmassiga lihtsate, ühe või kahe funktsionaalrühmaga molekulide puhul on eeldatav vahe erinevate, funktsionaalrühmade osaväärtusi arvestavate meetodite abil leitud ning mõõdetavate log P_{OW} väärtuste vahel 0,1–0,3 ühikut. Keerukamate molekulide puhul võib veapiir olla suurem. See sõltub nii saadaval olevate rühmakonstantide usaldusväärsusest kui ka oskusest hinnata sisemolekulaarseid vastasmõjusid (nt vesiniksidemeid) ja kasutada vastavaid parandusliikmeid (viimane probleem ei ole arvutitarkvara CLOGP-3 kasutamisel eriti oluline) (b). Dissotsieeruvate ühendite puhul on oluline arvestada õigesti dissotsiatsiooniastet ja vastava iooni laengut.

▼B

Arvutuskäik

Hanschi π-meetod

Algne hüdrofoobse asendaja konstant π, mille võtsid kasutusele Fujita jt (f), määratletakse järgmiselt:

$\pi_x = \log P_{ow}$ (PhX) - $\log P_{ow}$ (PhH)

kus P_{OW} (PhX) on aromaatse derivaadi jaotustegur ja P_{OW} (PhH) lähteaine jaotustegur.

(e.g. $\pi_{Cl} = \log P_{ow}$ (C_6H_5Cl) - $\log P_{ow}$ (C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71).

Vastavalt määratlusele on π-meetod kohaldatav peamiselt aromaatsetele asendussaadustele. Paljude asendajate π-väärtused on esitatud koondtabelitena (b, c, d). Neid kasutatakse aromaatsete molekulide või alamstruktuuride log P_{OW} arvutamisel.

Rekkeri meetod

Rekkeri (g) järgi arvutatakse log P_{OW} väärtus järgmiselt:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j$$

kus f_i tähistab erinevaid rühmakonstante ja a_i nende esinemissagedust uuritavas molekulis. Parandusliikmed võib väljendada summaarselt konstandi C_m (nn maagilise konstandi) korrutisena. Rühmakonstandid f_i ja C_m leiti mitme muutujaga regressioonianalüüsi abil 825 ühendi 1 054 eksperimentaalse P_{OW} väärtuse põhjal (c, h). Vastasmõju arvestavad liikmed määratakse vastavalt kirjanduses toodud eeskirjadele (e, h, i).

Hanschi-Leo meetod

Hanschi ja Leo (c) järgi arvutatakse log P_{OW} väärtus järgmiselt:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

kus f_i tähistab erinevaid rühmakonstante, F_j parandusliikmeid ja a_i, b_j vastavaid esinemissagedusi. Paljude eksperimentaalsete P_{OW} väärtuste põhjal koostati katse-eksituse meetodil aatomite ja funktsionaalrühmade osaväärtuste ning parandusliikmete F_j (nn faktorite) nimekiri. Parandusliikmed on jagatud mitmesse eri klassi (a, c). Kõigi reeglite ja parandusliikmete arvestamine on suhteliselt keerukas ja aeganõudev. Selleks otstarbeks on välja töötatud vastavad tarkvarapaketid (b).

Kombineeritud meetod

Keerukate molekulide log P_{OW} arvutamise täpsust on oluliselt võimalik suurendada, kui jagada molekul suuremateks alamstruktuurideks, mille kohta on olemas usaldusväärsed log P_{OW} väärtused kas tabelites (b), (c) või on need saadud isiklikel mõõtmistel. Selliseid fragmente (nt heterotsükleid, antrakinooni, asobenseeni) võib seejärel kombineerida Hanschi π-väärtuste või Rekkeri või Leo rühmakonstantidega.

Märkused

i) Osaliselt või täielikult dissotsieerunud ühenditele saab arvutusmeetodeid kohaldada ainult juhul, kui on võimalik arvestada vajalikke parandustegureid.

▼B

ii) Kui võib eeldada sisemolekulaarsete vesiniksidemete olemasolu, tuleb vastavad parandusliikmed liita (ligikaudu + 0,6 kuni + 1,0 log P_{OW} ühikut) (a). Viiteid selliste sidemete olemasolu kohta võib leida molekuli ruumilistest mudelitest või spektroskoopilistest andmetest.

iii) Kui võimalik on mitu tautomeerset vormi, kasutatakse arvutustes kõige suurema tõenäosusega vormi.

iv) Hoolikalt tuleks jälgida muudatusi rühmakonstantide tabelites.

Aruanne

Arvutus-/hindamismeetodite kasutamisel peaks katsearuanne võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— aine kirjeldust (segu, lisandid jne);

— märkeid võimalike sisemolekulaarsete vesiniksidemete, dissotsiatsiooni, laengu ja mis tahes muude ebaharilike nähtuste kohta (nt tautomeeria);

— arvutusmeetodi kirjeldust;

— märget kasutatud andmebaasi kohta või andmebaasi ennast;

— lahknevusi tavapärasest fragmentide valikust;

— põhjalikku arvutusdokumentatsiooni.

KIRJANDUS

a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 1979, vol. 14,479.

f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.

g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.

h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12,1459.

i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

2.liide

Soovitatavad võrdlusained HPLC meetodi puhul

Nr	Võrdlusaine	log P_{OW}	pKa
1	2-butanoon	0,3	
2	4-atsetüülpüridiin	0,5	
3	Aniliin	0,9	
4	Atseetaniliid	1,0	
5	Bensüülalkohol	1,1	
6	p-metoksüfenool	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoksüäädikhape	1,4	pKa = 3,12
8	Fenool	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenool	1,5	pKa = 3,96
10	Bensonitriil	1,6	
11	Fenüülatsetonitriil	1,6	
12	4-metüülbensüülalkohol	1,6	
13	Atsetofenoon	1,7	
14	2-nitrofenool	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobensoehape	1,8	pKa = 3,47
16	4-kloroaniliin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenseen	1,9	
18	Kaneelalkohol	1,9	
19	Bensoehape	1,9	pKa = 4,19
20	p-kresool	1,9	pKa = 10,17
21	Kaneelhape	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisool	2,1	
23	Metüülbensoaat	2,1	
24	Benseen	2,1	
25	3-metüülbensoehape	2,4	pKa = 4,27
26	4-klorofenool	2,4	pKa = 9,1
27	Trikloroetüleen	2,4	
28	Atrasiin	2,6	
29	Etüülbensoaat	2,6	
30	2,6-diklorobensonitriil	2,6	
31	3-klorobensoehape	2,7	pKa = 3,82
32	Tolueen	2,7	
33	1-naftool	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dikloroaniliin	2,8	
35	Klorobenseen	2,8	
36	Allüülfenüüleeter	2,9	
37	Bromobenseen	3,0	

▼B

Nr	Võrdlusaine	log P_{OW}	pKa
38	Etüülbenseen	3,2	
39	Bensofenoon	3,2	
40	4-fenüülfenool	3,2	pKa = 9,54
41	Tümool	3,3	
42	1,4-diklorobenseen	3,4	
43	Difenüülamiin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftaleen	3,6	
45	Fenüülbensoaat	3,6	
46	Isopropüülbenseen	3,7	
47	2,4,6-triklorofenool	3,7	pKa = 6
48	Bifenüül	4,0	
49	Bensüülbensoaat	4,0	
50	2,4-dinitro-6-sec-butüülfenool	4,1	
51	1,2,4-triklorobenseen	4,2	
S2	Dodekaanhape	4,2	
53	Difenüüleeter	4,2	
54	Butüülbenseen	4,5	
55	Fenantreen	4,5	
56	Fluoranteen	4,7	
57	Dibensüül	4,8	
58	2,6-difenüülpüridiin	4,9	
59	Trifenüülamiin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Muud madala log P_{OW} väärtusega võrdlusained		
1	Nikotiinhape	- 0,07	

▼B

A.9. **LEEKPUNKT**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Katse tegemiseks on kasulik teada aine süttivust. Katsemeetod sobib vedelikele, mille aurud võivad süüteallika abil süttida. Siintoodud katsemeetodid annavad usaldusväärseid tulemusi ainult iga meetodi puhul märgitud leekpunkti vahemikus.

Kasutatava meetodi valikul tuleks arvestada keemiliste reaktsioonide võimalusega aine ja proovianuma vahel.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Leekpunkt on madalaim, normaalrõhule 101,325 kPa normaliseeritud temperatuur, mille juures eraldub vedelikust katsemeetodis määratletud tingimustel aure sellises koguses, et katseanumas tekib süttiv auru/õhu segu.

Ühikud: °C

$t = T - 273{,}15$

(t (°C) ja T (K))

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Aine viiakse katseanumasse ja soojendatakse või jahutatakse iga meetodi puhul kirjeldatud protseduuri kohaselt katsetemperatuurini. Veendumaks, kas proov katsetemperatuuril süttib või mitte, tehakse süütamiskatsed.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

1.5.1. **Korratavus**

Korratavus varieerub vastavalt leekpunkti vahemikule ja kasutatavale katsemeetodile; maksimum on 2 °C.

1.5.2. **Tundlikkus**

Tundlikkus sõltub kasutatavast katsemeetodist.

1.5.3. **Spetsiifilisus**

Osade katsemeetodite spetsiifilisus piirdub kindlate leekpunkti vahemikega ja sõltub ainespetsiifilistest omadustest (nt kõrge viskoossus).

▼B

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Ettevalmistused**

Testaine proov viiakse punktidele 1.6.3.1 ja/või 1.6.3.2 vastavasse katseseadmesse.

Ohutuse huvides on kõrge siseenergiaga või mürgiste ainete puhul soovitatav kasutada väikest proovikogust, u 2 cm^3, kasutavaid meetodeid.

1.6.2. **Katsetingimused**

Kui see ei ole vastuolus ohutusnõuetega, tuleks katseseade paigaldada tõmbevabasse asukohta.

1.6.3. **Katse tegemine**

1.6.3.1. *Tasakaaluline meetod*

Vt ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Mittetasakaaluline meetod*

Abeli seade

Vt BS 2000, 170. osa, NF M07-011, NF T66-009.

Abel-Pensky seade

Vt EN 57, DIN 51755, 1. osa (temperatuuridele 5–65 °C), DIN 51755, 2. osa (temperatuuridele alla 5 °C), NF M07-036.

Tagi seade

Vt ASTM D 56.

Pensky-Martensi seade

Vt ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Märkused

Kui mittetasakaalulise meetodiga (1.6.3.2) määratud leekpunkt on 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C või 55 ± 2 °C, tuleb saadud tulemust kinnitada sama seadmega ja tasakaalulise meetodi abil.

Teavitamiseks võib kasutada ainult meetodeid, mille abil saab määrata leekpunkti temperatuuri.

Viskoossete, lahusteid sisaldavate vedelike (värvid, kummid jms) leekpunkti määramiseks võib kasutada ainult viskoossete vedelike leekpunkti määramiseks ette nähtud seadmeid ja katsemeetodeid.

Vt ISO 3679, ISO 368O, ISO 1523, DIN 53213, 1. osa.

▼B

2. **ANDMED**

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— kasutatud meetodit ja võimalikke kõrvalekaldeid sellest;

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid andmeid ja lisamärkusi.

4. **VIITED**

Puuduvad.

▼B

A.10. SÜTTIVUS (TAHKED AINED)

1. MEETOD

1.1. SISSEJUHATUS

Katse tegemiseks on kasulik teada aine võimalikku plahvatusohtlikkust.

Käesolevat katset tuleks kasutada ainult pulbriliste, teraliste või pastataoliste ainete puhul.

Et mitte hõlmata kõiki süttivaid aineid, vaid ainult kiiresti põlevaid või eriti ohtlike põlemisomadustega aineid, loetakse väga tuleohtlikuks ainult neid aineid, mille põlemiskiirus ületab teatava piirväärtuse.

Eriti ohtlik võib olla hõõgumise levik läbi metallipuru, kuna see raskendab tule kustutamist. Metallipulbrid tuleks lugeda väga tuleohtlikuks, kui hõõgumisprotsess levib teatava aja jooksul läbi kogu pulbri massi.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Põlemisaeg sekundites.

1.3. VÕRDLUSAINED

Nimetamata.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ainest moodustatakse umbes 250 mm pikkune katkestusteta pulbririba ja tehakse esialgne sõelkatse kontrollimaks, kas gaasileegiga süütamisel levib põlemisprotsess leegi või hõõgumisena edasi. Kui põlemisprotsess levib kindlaksmääratud aja jooksul läbi 200 mm riba, viiakse põlemiskiiruse määramiseks läbi täiemahuline katseprogramm.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Täpsustamata.

▼B

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Esialgne sõelkatse**

Ainest moodustatakse mittesüttivale, mittepoorsele ja madala soojusjuhtivusega alusplaadile umbes 250 mm pikkune, 20 mm laiune ja 10 mm kõrgune katkestusteta pulbririba. Pulbririba ühele otsale suunatakse pulbri süttimiseni või kuni kaheks minutiks (metallide või metallisulamite pulbrite puhul viieks minutiks) vähemalt 5 mm läbimõõduga gaasipõleti leek. Tehakse kindlaks, kas põlemisprotsess läbib neljaminutilise (metallipulbrite puhul 40minutilise) katseaja jooksul 200 mm ribaosa. Kui pulber ei sütti või põlemisprotsess (leek või hõõgumine) ei läbi neljaminutilise (või 40minutilise) katseaja jooksul 200 mm pulbririba, ei loeta ainet väga tuleohtlikuks ja rohkem katseid sellega ei tehta. Kui põlemisprotsess läbib 200 mm pulbririba vähem kui nelja minutiga või metallipulbrite puhul vähem kui 40 minutiga, viiakse läbi allpool kirjeldatud protseduur (punkt 1.6.2 ja järgmised punktid).

1.6.2. **Põlemiskiiruse katse**

1.6.2.1. *Ettevalmistused*

250 mm pikk, kolmnurkse läbilõikega, 10 mm sisemise kõrguse ja 20 mm sisemise laiusega vorm täidetakse tihendamata pulbrilise või teralise ainega. Vormi kummalegi küljele paigaldatakse pikisuunas külgpiiranguteks kaks metallplaati, mis ulatuvad 2 mm üle kolmnurkse vao ülaääre (vt joonist). Vorm kukutatakse seejärel kolm korda 2 cm kõrguselt kõvale aluspinnale. Vajaduse korral täidetakse vorm seejärel uuesti. Külgmised piirangud eemaldatakse ja liigne aine kaabitakse ära. Vormi peale paigaldatakse seejärel mittesüttiv, mittepoorne ja madala soojusjuhtivusega alusplaat, keeratakse vorm koos plaadiga ümber ja eemaldatakse vorm.

Pastataolistest ainetest moodustatakse mittesüttivale, mittepoorsele ja madala soojusjuhtivusega alusplaadile 250 mm pikkune, umbes 1 cm^2 läbilõikepindalaga riba.

1.6.2.2. *Katsetingimused*

Niiskustundlike ainete puhul tehakse katse võimalikult kiiresti pärast aine hoiunõust eemaldamist.

1.6.2.3. *Katse tegemine*

Riba paigutatakse tõmbekapi alla õhu liikumise suunaga risti.

Õhu liikumise kiirus peab olema piisav, takistamaks suitsu levikut laborisse, ning seda tuleb katse jooksul konstantsena hoida. Seadme ümber tuleks paigaldada tõmbevari.

Riba üks ots süüdatakse vähemalt 5 mm läbimõõduga gaasipõleti leegi abil. Kui riba on 80 mm ulatuses põlenud, mõõdetakse järgneva 100 mm kestel põlemiskiirus.

▼B

Katset korratakse kuus korda, iga kord puhta jaheda alusplaadiga, välja arvatud juhul, kui ühel katsel on juba saadud positiivne tulemus.

2. **ANDMED**

Hindamisel on vajalikud esialgse sõelkatse (1.6.1) põlemisaeg ja kuni kuuel põhikatsel (1.6.2.3) leitud lühim põlemisaeg.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— katseaine kirjeldust, füüsikalist olekut ja niiskusesisaldust;

— esialgse sõelkatse ja põlemiskiiruse katse tulemusi (kui see tehti);

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Pulbrilised, teralised või pastataolised ained loetakse väga tuleohtlikuks, kui nende põlemisaeg punktis 1.6.2 kirjeldatud mis tahes katseprotseduuris on alla 45 sekundi. Metallide või metallisulamite pulbrid loetakse väga tuleohtlikuks juhul, kui need süttivad ja leek või reaktsioonivöönd levib kümne minutiga või kiiremini üle kogu proovi.

4. **VIITED**

1. NF T 20-042 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

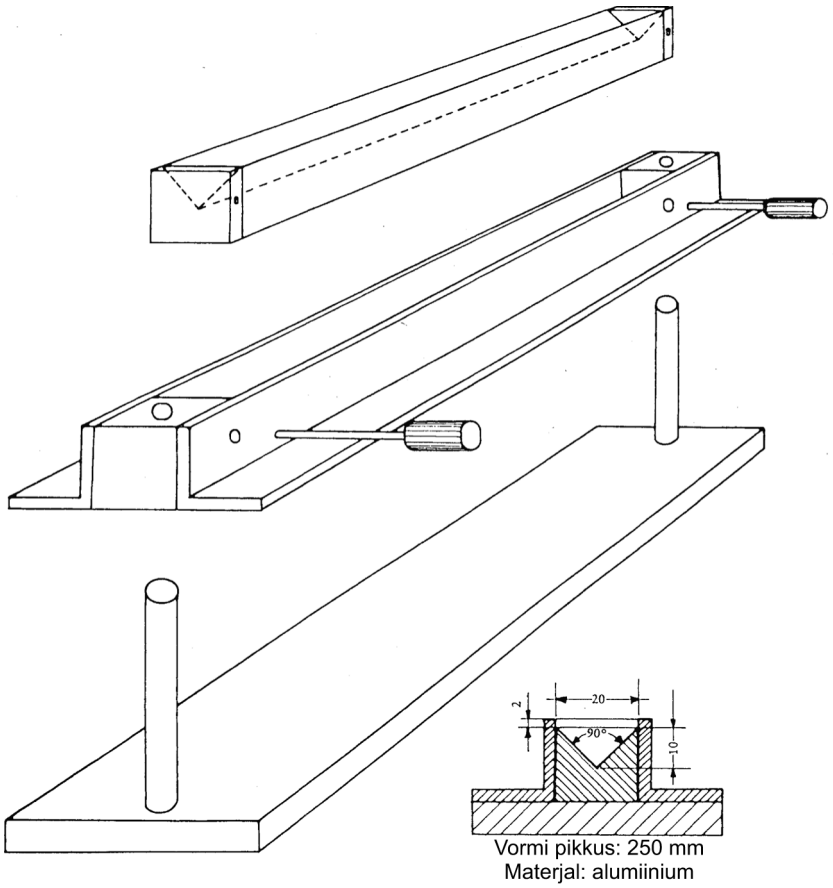
▼B

Liide

Joonis

Põlemisriba valmistamise vorm ja abivahendid

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



▼B

A.11. SÜTTIVUS (GAASID)

1. MEETOD

1.1. SISSEJUHATUS

See meetod võimaldab määrata õhuga segunenud gaaside süttivust toatemperatuuril (u 20 °C) ja atmosfäärirõhul ning süttivate gaaside puhul kontsentratsioonivahemikku, milles nad süttivad. Järjest suurenevate kontsentratsioonidega katsegaasi-õhu segudes tekitatakse elektrisäde ja jälgitakse, kas gaas süttib.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Süttimispiirkond on kontsentratsioonivahemik alumise ja ülemise plahvatuspiiri vahel. Alumine ja ülemine plahvatuspiir on piirkontsentratsioonid, mille puhul leek õhuga segatud gaasis ei levi.

1.3. VÕRDLUSAINED

Nimetamata.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Gaasi kontsentratsiooni õhus suurendatakse järk-järgult ja igas etapis tekitatakse segus elektrisäde.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Täpsustamata.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Seade**

Katseanumaks on kummuli klaassilinder sisediameetriga vähemalt 50 mm ja kõrgusega vähemalt 300 mm. 3–5 mm vahekaugusega süüteelektroodid paigutatakse 60 mm kõrgusele silindri põhjast. Silindril on survepääsuklapiga ava. Plahvatuskahjustuste vältimiseks tuleb seade varjestada.

Süüteallikana kasutatakse püsivat 0,5 s kestusega induktsioonsädet, mis tekitatakse 10–15 kV väljundpingega kõrgepingetrafo (maksimaalne sisendvõimsus 300 W) abil. Sobivat seadet on näiteks kirjeldatud viites 2.

1.6.2. **Katsetingimused**

Katse viiakse läbi toatemperatuuril (u 20 °C).

▼B

1.6.3. **Katse tegemine**

Doseerpumpade abil viiakse klaassilindrisse kindla kontsentratsiooniga gaasi-õhu segu. Segus tekitatakse säde ja jälgitakse, kas süüteallikast eraldub leek ja levib gaasis iseseisvalt. Gaasikontsentratsiooni muudetakse 1 % kaupa kuni eespool kirjeldatud süttimise toimumiseni.

Kui gaasi keemiline struktuur viitab mittesüttivusele ja on võimalik välja arvutada stöhhiomeetrilise gaasiõhu segu koostis, siis kontrollitakse selliste 1 % astmetega ainult segusid kontsentratsioonivahemikus 10 % alla ja 10 % üle stöhhiomeetrilise kontsentratsiooni.

2. **ANDMED**

Ainus selle omaduse määramisel oluline teave on leegi levimine.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— kasutatud seadme kirjeldust koos mõõtmetega;

— katsetemperatuuri;

— katsekontsentratsioone ja saadud tulemusi;

— katse tulemust: mittesüttiv gaas või väga tuleohtlik gaas;

— kui järeldatakse, et gaas on mittesüttiv, tuleks ära märkida kontsentratsioonivahemik, milles seda 1 % sammude kaupa testiti;

— registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamisega seonduvad andmed ja märkused.

4. **VIITED**

1. NF T 20-041 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

2. W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol 56, 2, 126-127.

▼B

A.12. **SÜTTIVUS (KOKKUPUUTEL VEEGA)**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Meetodi abil saab kontrollida, kas aine reaktsioonil vee või niiske õhuga tekib ohtlikus koguses gaasi või gaase, mis võivad olla väga tuleohtlikud.

Katsemeetod on kohaldatav nii tahketele kui ka vedelatele ainetele. Meetod ei ole kohaldatav ainetele, mis kokkupuutel õhuga iseeneslikult süttivad.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Väga tuleohtlik: ained, mis kokkupuutel vee või niiske õhuga eraldavad ohtlikus koguses väga tuleohtlikke gaase kiirusega vähemalt 1 liiter/kg kohta tunnis.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ainet kontrollitakse vastavalt allpool esitatud etapiviisilisele eeskirjale; kui mis tahes etapis leiab aset süttimine, pole edasine kontrollimine vajalik. Kui on teada, et aine veega ägedalt ei reageeri, jätkatakse 4. etapiga (1.3.4).

1.3.1. **1. etapp**

Testaine viiakse 20 °C destilleeritud vett sisaldavasse süvendisse ja kontrollitakse, kas tekkiv gaas süttib.

1.3.2. **2. etapp**

Testaine kantakse 20 °C destilleeritud vett sisaldavas tassis ujuvale filterpaberile ja kontrollitakse, kas tekkiv gaas süttib. Filterpaberi ainus ülesanne on ainet koos hoida ja süttimise tõenäosust suurendada.

1.3.3. **3. etapp**

Testainest moodustatakse ligikaudu 2 cm kõrgune ja 3 cm läbimõõduga kuhi. Kuhjale lisatakse mõned tilgad vett ja kontrollitakse, kas tekkiv gaas süttib.

1.3.4. **4. etapp**

Testaine segatakse 20 °C destilleeritud veega ja mõõdetakse seitsme tunni jooksul ühetunniste vahedega gaasi eraldumise kiirust. Kui gaas eraldub ebaühtlase kiirusega või kiirus kasvab veel seitsme tunni pärast, pikendatakse mõõtmisaega kuni viie päevani. Kui kiirus ületab mis tahes ajahetkel 1 liitri/kg kohta tunnis, võib katse peatada.

▼B

1.4. VÕRDLUSAINED

Nimetamata.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Täpsustamata.

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

1.6.1. **1. etapp**

1.6.1.1. *Katsetingimused*

Katse tehakse toatemperatuuril (u 20 °C).

1.6.1.2. *Katse tegemine*

Väike (ligikaudu 2 mm läbimõõduga) kogus testainet viiakse destilleeritud vett sisaldavasse süvendisse. Kontrollitakse, kas i) eraldub gaasi ja ii) kas gaas süttib. Kui gaas süttib, pole edasine uurimine vajalik, kuna aine loetakse ohtlikuks.

1.6.2. **2. etapp**

1.6.2.1. *Seade*

Mis tahes sobivas nõus, näiteks 100 mm läbimõõduga aurustuskausis, asetatakse destilleeritud vee pinnale filterpaber.

1.6.2.2. *Katsetingimused*

Katse tehakse toatemperatuuril (u 20 °C).

1.6.2.3. *Katse tegemine*

Väike (ligikaudu 2 mm läbimõõduga) kogus testainet kantakse filterpaberi keskkohta. Kontrollitakse, kas i) eraldub gaasi ja ii) kas gaas süttib. Kui gaas süttib, pole edasine uurimine vajalik, kuna aine loetakse ohtlikuks.

1.6.3. **3. etapp**

1.6.3.1. *Katsetingimused*

Katse tehakse toatemperatuuril (u 20 °C).

1.6.3.2. *Katse tegemine*

Testainest moodustatakse ligikaudu 2 cm kõrgune ja 3 cm läbimõõduga kuhi süvendiga tipus. Auku lisatakse mõned tilgad vett ja kontrollitakse, kas i) eraldub gaasi ja ii) kas gaas süttib. Kui gaas süttib, pole edasine uurimine vajalik, kuna aine loetakse ohtlikuks.

▼B

1.6.4. **4. etapp**

1.6.4.1. *Seade*

Katseseade valmistatakse vastavalt joonisele.

1.6.4.2. *Katsetingimused*

Kontrollida, kas testaine hoiuanumas leidub < 500 μm suuruseid osakesi sisaldavat pulbrit. Kui sellise pulbri sisaldus koguhulgas on üle 1 % mahu järgi või kui materjal on pude, tuleks kogu aine enne katsetusi pulbriks jahvatada, et arvestada osakeste suuruse vähenemisega ladustamisel ja käitlemisel; vastasel juhul uuritakse ainet töötlemata kujul. Katse tuleks teha toatemperatuuril (u 20 °C) ja atmosfäärirõhul.

1.6.4.3. *Katse tegemine*

Seadme tilklehtrisse viiakse 10–20 ml vett ja seadme koonilisse kolbi viiakse 10 g ainet. Eralduva gaasi ruumala mõõdetakse mis tahes sobiva meetodiga. Tilklehtri kraan avatakse, nii et vesi pääseb koonilisse kolbi, ja käivitatakse stopper. Gaasi eraldumise kiirust mõõdetakse seitsme tunni jooksul ühetunniste vahedega. Kui gaasi eraldumise kiirus on selle aja kestel ebaühtlane või kasvab veel selle ajavahemiku lõpus, pikendatakse mõõtmisaega kuni viie päevani. Kui gaasi eraldumise kiirus ületab mis tahes ajahetkel 1 liitri/kg kohta tunnis, võib katse peatada. Tuleks teha kolm paralleelkatset.

Kui ei ole teada, mis gaasiga on tegemist, tuleks seda analüüsida. Kui gaas sisaldab väga tuleohtlikke komponente ja ei ole teada, kas summaarne segu on väga tuleohtlik, tuleb valmistada sama koostisega segu ja kontrollida seda vastavalt meetodile A.11.

2. **ANDMED**

Aine loetakse ohtlikuks kui

— mis tahes katseetapis leiab aset iseeneslik süttimine

või

— eraldub tuleohtlikke gaase kiirusega vähemalt 1 liiter/kg aine kohta tunnis.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— testaine ettevalmistamise andmeid;

▼B

— katsete tulemusi (1., 2., 3. ja 4. etapp);

— eralduva gaasi keemilist koostist;

— 4. etapi (1.6.4) käigus gaasi eraldumise kiirust;

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

4. **VIITED**

1. Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

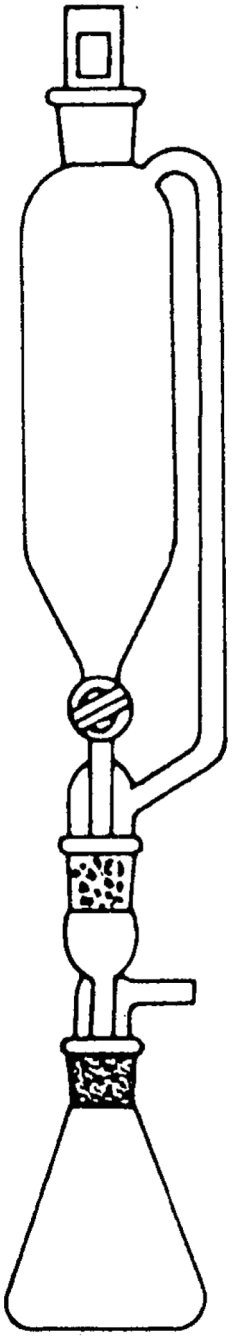
2. NF T 20-040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Liide

Joonis

Seade



▼B

A.13. TAHKETE AINETE JA VEDELIKE ISESÜTTIVUS

1. MEETOD

1.1. SISSEJUHATUS

Katsemeetod on kohaldatav tahketele ja vedelatele ainetele, mis väikestes kogustes toatemperatuuril (u 20 °C) õhuga kokku puutudes lühikese aja jooksul iseeneslikult süttivad.

Katsemeetod ei hõlma aineid, mis peavad iseeneslikuks süttimiseks toatemperatuuril või kõrgemal temperatuuril õhuga kokku puutuma mitu tundi või päeva.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Ained loetakse isesüttivateks, kui need süttivad või söestuvad punktis 1.6 kirjeldatud tingimustel.

Vedelike isesüttivust võib vaja olla kontrollida ka meetodi A.15 „Isesüttimistemperatuur (vedelikud ja gaasid)” kohaselt.

1.3. VÕRDLUSAINED

Nimetamata.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Tahke aine või vedelik kantakse inertsele tugiainele ja viiakse toatemperatuuril viieks minutiks kokkupuutesse õhuga. Kui vedelik sellistes tingimustes ei sütti, imetakse see filterpaberisse ja viiakse toatemperatuuril (u 20 °C) viieks minutiks kokkupuutesse õhuga. Kui tahke aine või vedelik süttib või kui vedelik süütab või söestab filterpaberi, loetakse aine isesüttivaks.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Korratavus: kuna ohutus on oluline, loetakse aine isesüttivaks juba siis, kui üks tulemus on positiivne.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Seade**

Umbes 10 cm läbimõõduga portselantass täidetakse toatemperatuuril (u 20 °C) umbes 5 mm kõrguselt diatomiitmullaga.

Märkus

Diatomiitmulla või mis tahes muu saadaval oleva võrreldava inertse ainega simuleeritakse mulda, millesse testaine õnnetusjuhtumi korral võib voolata.

Inertsel kandjal õhuga kokku puutudes mittesüttivate vedelike testimiseks on vaja filterpaberit.

▼B

1.6.2. **Katse tegemine**

a) *Pulbrilised tahked ained*

1–2 cm^3 uuritavat pulbrit valatakse u 1 m kõrguselt mittesüttivale pinnale ja jälgitakse, kas aine süttib kukkumisel või mahalangemisest viie minuti jooksul.

Katset korratakse kuus korda, kui aine enne ei sütti.

b) *Vedelikud*

U 5 cm^3 uuritavat vedelikku valatakse ette valmistatud portselantassi ja jälgitakse, kas aine süttib viie minuti jooksul.

Kui aine kuue katse jooksul ei sütti, tuleb teha järgmised katsed:

0,5 ml testaine proov viiakse süstla abil sälgustatud filterpaberile ja jälgitakse, kas filterpaber süttib või söestub viie minuti jooksul vedeliku lisamisest. Katset korratakse kolm korda, kui paber enne ei sütti ega söestu.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE KÄSITLEMINE

Katsed võib peatada kohe pärast positiivse tulemuse saamist mis tahes katses.

2.2. HINDAMINE

Kui aine süttib viie minuti jooksul pärast inertsele tugiainele kandmist ja õhu kätte viimist või kui vedelik süütab või söestab filterpaberi viie minuti jooksul pärast lisamist ja õhu kätte viimist, loetakse aine isesüttivaks.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— aine täpset kirjeldust (koostist ja lisandeid);

— katsete tulemusi;

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

4. **VIITED**

1. NF T 20-039 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

2. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14. **PLAHVATUSOHTLIKKUS**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Meetod näeb ette katseskeemi, mille abil kontrollitakse, kas tahke või pastataoline aine on plahvatusohtlik kokkupuutel leegiga (termiline tundlikkus), löögi või hõõrdumise mõjul (mehaaniline tundlikkus) ja kas vedelik on leegi või löögi mõjul plahvatusohtlik.

Meetod koosneb kolmest osast:

a) termilise tundlikkuse katse (1);

b) mehaanilise tundlikkuse katse löögi suhtes (1);

c) mehaanilise tundlikkuse katse hõõrdumise suhtes (1).

Meetodi abil saadakse andmeid teatavate tavapäraste mõjuritega seotud plahvatusohu hindamiseks. Meetod ei ole mõeldud aine plahvatusohtlikkuse kontrollimiseks mis tahes tingimustes.

Meetod sobib ainega seotud plahvatusohu (termilise ja mehaanilise tundlikkuse) määramiseks konkreetsetel direktiivis täpsustatud tingimustel. Meetodi puhul kasutatakse mitut tüüpi katseseadmeid, mis on laias rahvusvahelises kasutuses (1) ja mis annavad tavaliselt usaldusväärseid tulemusi. On selge, et meetod ei ole ammendav. Kirjeldatud seadmete asemel võib kasutada muid seadmeid eeldusel, et need on rahvusvaheliselt tunnustatud ja tulemused on piisavalt sarnased kirjeldatud seadmetel saadavate tulemustega.

Katseid ei ole vaja teha juhul, kui saadaval olevad termodünaamilised andmed (nt tekkesoojus, lagunemissoojus) ja/või teatavate funktsionaalrühmade (2) puudumine struktuurivalemis tõestavad põhjendatud kahtluseta, et toimeaine ei lagune kiirelt gaaside või soojuse eraldumisega (st materjal ei ole plahvatusohtlik). Mehaanilise tundlikkuse katse hõõrdumise suhtes ei ole vedelike puhul nõutav.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Lõhkeaine

Ained, mis võivad leegi mõjul plahvatada või on kirjeldatud seadmes löögi- või hõõrdetundlikud (või on muus seadmes suurema mehaanilise tundlikkusega kui 1,3-dinitrobenseen).

1.3. VÕRDLUSAINED

1,3-dinitrobenseen, tehniline kristalne saadus, läbib 0,5 mm sõela, hõõrdumis- ja löögimeetoditele.

Perhüdro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triasiin (RDX, heksogeen, tsükloniit, CAS-i nr 121-82-4), kristallitud tsükloheksanooni vesilahusest, märgsõelutud läbi 250 µm sõela ja kinni peetud 150 µm sõelal, kuivatatud neli tundi 103 ± 2 °C juures, hõõrdumis- ja löögikatsete teise seeria jaoks.

▼B

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Eelkatsed on vajalikud kolme tundlikkuskatse tarvis ohutute tingimuste määramiseks.

1.4.1. **Käsitlemisohutuse katsed (3)**

Ohutuse huvides rakendatakse väga väikestele proovidele (u 10 mg) enne põhikatsete tegemist kuumutamist gaasileegis vabas õhus, lööke mis tahes tavapärastes seadmetes ja hõõrdumist vasara ja alasi vahel või mis tahes muus hõõrdumisseadmes. Selle eesmärk on kontrollida, kas aine on nii tundlik ja plahvatusohtlik, et ettenähtud tundlikkuskatsetel, eriti termilise tundlikkuse katsetel, tuleb katse tegija vigastamise vältimiseks kasutada erilisi ettevaatusabinõusid.

1.4.2. **Termiline tundlikkus**

Meetodi puhul kuumutatakse ainet erinevas läbimõõdus düüsidega plaatidega suletud terashülsis, et kontrollida, kas aine võib tugeva kuumuse ja piiratud ruumala tingimustes plahvatada.

1.4.3. **Mehaaniline tundlikkus (löögitundlikkus)**

Meetodi puhul antakse ainele kindlalt kõrguselt kukutatud kindla massiga löök.

1.4.4. **Mehaaniline tundlikkus (hõõrdetundlikkus)**

Meetodi puhul mõjutatakse tahkeid ja pastataolisi aineid standardsel pinnal määratud koormuse ja suhtelise liikumise abil tekitatud hõõrdumisega.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Täpsustamata.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Termiline tundlikkus (leegi mõju)**

1.6.1.1. *Seade*

Seade koosneb ühekordselt kasutatavast terashülsist korduvkasutatava sulguriga (joonis 1), mis on paigutatud kaitsvasse kuumutusseadmesse. Kõik hülsid on valmistatud sügavtõmbamisel lehterasest (vt liidet) ja on 24 mm sisediameetriga, 75 mm pikad ja 0,5 mm paksuse seinaga. Hülssidel on avatud otsas äärik hülsi sulgemiseks düüsiga plaadiga sulgurseadme abil. Sulgur koosneb keskel asuva düüsiga survekindlast plaadist, mis kaheosalise keermega liitmiku (mutter ja keermega võru) abil kindlalt hülsi külge kinnitatakse. Mutter ja keermega võru on valmistatud kroom-mangaanterasest (vt liidet), mis on sädemevaba kuni temperatuurini 800 °C. Düüsiga plaadid on 6 mm paksud, valmistatud kuumuskindlast terasest (vt liidet) ja neid on mitmesuguse avasuurusega.

▼B

1.6.1.2. *Katsetingimused*

Tavaliselt uuritakse ainet töötlemata kujul, kuid mõningatel juhtudel, nt kui see on kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud, võib olla vaja see enne katsetusi purustada.

Tahkete ainete puhul määratakse katsetes kasutatav ainekogus kaheetapilisel proovitäitmisel. Kaalutud hülss täidetakse 9 cm^3 ainega ja tambitakse kogu hülsi ristlõike ulatuses avaldatava 80 N jõuga kokku. Ohutuse huvides või juhtudel, kus proovi füüsikaline olek võib surve mõjul muutuda, võib kasutada muid täitmismeetodeid; nt väga hõõrdetundliku aine puhul ei saa tampimist kasutada. Kui ainet on võimalik kokku suruda, lisatakse veel ainet ja jätkatakse tampimist, kuni hülss on täidetud 55 mm kauguseni ülaäärest. Määratakse hülsi 55 mm tasemeni täitmiseks vajalik ainekogus ja lisatakse veel kaks lisakogust, mis kumbki 80 N jõuga tampimisel tihendatakse. Seejärel ainet vastavalt vajadusele kas lisatakse ja tambitakse või eemaldatakse, nii et hülss täitub 15 mm kõrguseni ülaäärest. Järgmiseks tehakse teine proovitäitmine, alustades tambitud ainekogusega, mis moodustab kolmandiku esimesel proovitäitmisel leitud kogumassist. Lisatakse veel kaks lisakogust, mis 80 N jõuga tampimisel tihendatakse, ja ainekogus reguleeritakse lisamisel või eemaldamisel 15 mm kõrguseni ülaäärest. Teisel proovitäitmisel leitud ainekogust kasutatakse edasistes katsetes, täites hülsi kolmes võrdses osas, mis surutakse kokku ruumalani 9 cm^3 mis tahes selleks vajaliku jõuga. (Selleks võib abivahendina kasutada vaherõngaid).

Vedelikud ja geelid viiakse hülssi 60 mm kõrguseni, vältides geelide puhul hoolikalt õhuvahede teket. Keermega võru libistatakse altpoolt hülsi peale, paigaldatakse sobiv düüsiga plaat ja keeratakse mutter pärast molübdeendisulfiidmäärde lisamist kinni. Väga oluline on kontrollida, et ainet ei jääks ääriku ja plaadi või keermete vahele.

Kuumutamisel kasutatakse propaani rõhuregulaatori (60–70 mbar) ja voolumõõturiga tööstuslikust balloonist, millest gaas jagatakse jaotustoru kaudu ühtlaselt (kontrollitakse visuaalselt põletite leekide järgi) nelja põleti vahel. Põletid asetsevad ringikujuliselt ümber katsekambri, nagu on näidatud joonisel 1. Kolme põleti kogukulu on umbes 3,2 liitrit propaani minutis. Kasutada võib muid küttegaase ja põleteid, kuid kuumutamise kiirus peab vastama joonisel 3 täpsustatule. Kõigi seadmete puhul tuleb kuumutamise kiirust regulaarselt kontrollida, kasutades selleks dibutüülftalaadiga täidetud hülsse, nagu on näidatud joonisel 3.

1.6.1.3. *Katsete tegemine*

Iga katset sooritatakse hülsi purunemiseni või viie minuti möödumiseni kuumutamise algusest. Plahvatusega lõppenuks loetakse katse, mille tulemusel hülss puruneb kolmeks või enamaks tükiks, mis võivad omavahel olla kitsaste metalliribadega ühendatud, nagu on näha jooniselt 2. Väiksema arvu tükkidega või purunemiseta lõppenud katset plahvatusega lõppenuks ei loeta.

▼B

Alguses tehakse kolm katset 6,0 mm düüsiga plaadiga ja kui plahvatust ei toimu, tehakse teine kolmene katseseeria 2,0 mm düüsiga plaadiga. Kui kummaski katseseerias plahvatust ei toimu, pole edasised katsed vajalikud.

1.6.1.4. *Hindamine*

Katse loetakse positiivseks, kui kummaski eespool nimetatud katseseerias toimub plahvatus.

1.6.2. **Mehaaniline tundlikkus (löögitundlikkus)**

1.6.2.1. *Seade (joonis 4)*

Tüüpilise kukkuva vasaraga seadme põhiosa on valuterasest plokk aluse, alasi, posti, juhtrööbaste, kukkuvate raskuste, päästiku ja proovianumaga. 100 mm (läbimõõt) × 70 mm (kõrgus) terasalasi on kruvitud 230 mm (pikkus) × 250 mm (laius) × 200 mm (kõrgus) terasplokile valatud 450 mm (pikkus) × 450 mm (laius) × 60 mm (kõrgus) alusele. Tõmmatud terastorust liitekohtadeta post on kinnitatud teraploki tagaküljel olevasse fiksaatorisse. Seade on nelja kruviga ankurdatud monoliitsele 60 × 60 × 60 cm betoonplokile nii, et juhtrööpad on täiesti püstsuunalised ja kukkuv raskus langeb vabalt. Kasutada saab nii 5 kg kui ka 10 kg monoliitsest terasest raskusi. Iga raskuse löökpea on valmistatud karastatud terasest, HRC 60–63, ja selle miinimumläbimõõt on 25 mm.

Uuritav proov on suletud löögiseadmesse, mis koosneb kahest koaksiaalsest, üksteise kohal paiknevast monoliitsest terassilindrist õõnsas silindrilises terasjuhtvõrus. Monoliitsed terassilindrid peaksid olema läbimõõduga 10 (– 0,003, – 0,005) mm ja kõrgusega 10 mm ning poleeritud pinna, ümarate nurkadega (kõverusraadius 0,5 mm) ja kõvadusega HRC 58–65. Õõnessilindril peab olema 16 mm välisdiameeter, poleeritud 10 (+ 0,005, + 0,010) mm sisediameeter ja 13 mm kõrgus. Vahealasile (läbimõõt 26 mm ja kõrgus 26 mm) on paigaldatud terasest löögiseade, mille keskosas on tekkivaid gaase läbi laskva perforatsiooniga rõngas.

1.6.2.2. *Katsetingimused*

Proov peaks olema mahuga 40 mm^3 või muule seadmele sobiva mahuga. Tahkeid aineid tuleks uurida kuivana ja need ette valmistada järgmiselt:

a) pulbrilised ained sõelutakse (sõela ava 0,5 mm) ja katses kasutatakse kogu sõela läbinud osa;

b) kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud materjalid purustatakse väiksemateks tükkideks ja sõelutakse; katses kasutatakse sõelumisel saadud fraktsiooni osakeste läbimõõduga 0,5–1 mm ja see fraktsioon peab esindama töötlemata algainet.

Tavaliselt pastadena tarnitavaid materjale tuleks võimaluse korral uurida kuivana või vähemalt eemaldada eelnevalt võimalikult suur osa lahjendist. Vedelikke testitakse 1 mm vahega alumise ja ülemise terassilindri vahel.

▼B

1.6.2.3. *Katsete tegemine*

Tehakse kuuest katsest koosnev katseseeria, kukutades 10 kg raskust 0,40 m kõrguselt (40 J). Kui kuue katse jooksul 40 J juures toimub plahvatus, tuleb teha järgmine kuue katsega katseseeria, kukutades 5 kg raskust 0,15 m kõrguselt (7,5 J). Muudes seadmetes võrreldakse proovi tunnustatud meetodi (nt üles-alla tehnika jne) abil valitud võrdlusainega.

1.6.2.4. *Hindamine*

Katse tulemus loetakse positiivseks, kui vähemalt ühel korral toimub kirjeldatud katseseadmetega mis tahes katses plahvatus (põlema lahvatamine ja/või paugatused on plahvatusega samaväärsed) või kui proov osutub muus löögikatses tundlikumaks kui 1,3-dinitrobenseen või RDX.

1.6.3. **Mehaaniline tundlikkus (hõõrdetundlikkus)**

1.6.3.1. *Seade (joonis 5)*

Hõõrdeseade koosneb valatud terasest alusplaadist, millele on paigaldatud hõõrdeseade. Viimane koosneb fikseeritud portselanpulgast ja liikuvast portselanplaadist. Portselanplaat asub kahel juhtrööpal jooksval kelgul. Kelk on ühendusvarda, ekstsentrilise nuki ja sobiva ülekande abil ühendatud elektrimootoriga nii, et portselanplaati liigutatakse portselanpulga all ainult üks kord 10 mm ulatuses edasi-tagasi. Portselanpulgale rakendatav jõud võib olla 120–360 N.

Tasased portselanplaadid on valmistatud valgest tehnilisest portselanist (jämedusega 9–32 μm) ja nende mõõtmed on 25 mm (pikkus) × 25 mm (laius) × 5 mm (kõrgus). Silindriline portselanpulk on samuti valmistatud valgest tehnilisest portselanist ja on 15 mm pikk, 10 mm läbimõõduga ja karestatud ümarate otsapindadega, mille kõverusraadius on 10 mm.

1.6.3.2. *Katsetingimused*

Proov peaks olema mahuga 10 mm^3 või muule seadmele sobiva mahuga.

Tahkeid aineid uuritakse kuivana ja nad valmistatakse ette järgmiselt:

a) pulbrilised ained sõelutakse (sõela ava 0,5 mm) ja katses kasutatakse kogu sõela läbinud osa;

b) kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud materjalid purustatakse väiksemateks tükkideks ja sõelutakse; katses kasutatakse sõelumisel saadud fraktsiooni osakeste läbimõõduga < 0,5 mm.

Tavaliselt pastadena tarnitavaid materjale tuleks võimaluse korral uurida kuivana. Kui pastast ei ole kuiva ainet võimalik valmistada, testitakse pastat (eemaldades eelnevalt võimalikult suur osa lahjendist) 0,5 mm paksuse, 2 mm laiuse ja 10 mm pikkuse, šablooni abil tekitatud kihina.

▼B

1.6.3.3. *Katsete tegemine*

Portselanpulk viiakse uuritava proovi kohale ja rakendatakse koormus. Katse ajal peavad karedad jooned portselanplaadil olema liikumissuunaga risti. Tuleb jälgida, et pulk toetuks proovile, et pulga all oleks küllaldane kogus testainet ja et plaat pulga all õigesti liiguks. Pastataolised ained kantakse plaadile 0,5 mm paksuse, 2 × 10 mm avaga šablooni abil. Portselanplaat peab portselanpulga all 0,44 sekundi jooksul 10 mm edasi ja tagasi liikuma. Iga plaadi ja pulga pinna osa võib kasutada ainult ühe korra; pulga mõlemat otsa võib kasutada kaheks katseks ja plaadi kumbagi külge kolmeks katseks.

360 N koormusega tehakse kuuest katsest koosnev katseseeria. Kui nende kuue katse käigus saadakse positiivne tulemus, tehakse 120 N koormusega veel üks kuuest katsest koosnev katseseeria. Muudes seadmetes võrreldakse proovi tunnustatud meetodi (nt üles-alla tehnika jne) abil valitud võrdlusainega.

1.6.3.4. *Hindamine*

Katse tulemus loetakse positiivseks, kui vähemalt ühel korral toimub kirjeldatud katseseadmetega mis tahes katses plahvatus (pragin ja/või paugatused või põlema lahvatamine on plahvatusega samaväärsed) või kui proov vastab muus hõõrdekatses võrdväärsetele tingimustele.

2. **ANDMED**

Aine loetakse direktiivi mõistes plahvatusohtlikuks juhul, kui termilise, löögi- või hõõrdetundlikkuse katses saadakse positiivne tulemus.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— testaine tunnusandmeid, koostist, puhtusastet, niiskusesisaldust jne;

— proovi füüsikalist olekut ja seda, kas seda on purustatud ja/või sõelutud;

— termilise tundlikkuse katsetes tehtud tähelepanekuid (nt proovi massi, kildude arvu jne);

— mehaanilise tundlikkuse katsetes tehtud tähelepanekuid (nt suure suitsukoguse teke või täielik lagunemine ilma paugatuste, leekide, sädemete, pragina jne esinemiseta);

— igat tüüpi katsete tulemusi;

— kui kasutatud on muid seadmeid, tuleb esitada teaduslik põhjendus ning tõendid tulemuste vastavuse kohta kirjeldatud seadmetel saadud tulemustega;

▼B

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid kommentaare, nagu viiteid katsetele analoogsete ainetega;

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE JA HINDAMINE

Katsearuandes tuleb ära märkida kõik tulemused, mis loeti valeks, anomaalseks või mitterepresentatiivseks. Kui mõnda tulemust ei arvestata, tuleb selle kohta lisada selgitus ja muude või täiendavate katsete tulemused. Kui anomaalsele tulemusele ei leidu seletust, tuleb seda arvestada täisväärtusliku tulemusena ja kasutada aine vastaval liigitamisel.

4. **VIITED**

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

2. Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750- 60103-5,1990.

3. Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.

4. NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of explosion risk.

▼B

Liide

Näitlik materjalide spetsifikatsioon termilise tundlikkuse katseks (vt DIN 1623)

1) Hülss: materjalispetsifikatsioon nr 1.0336 505 g

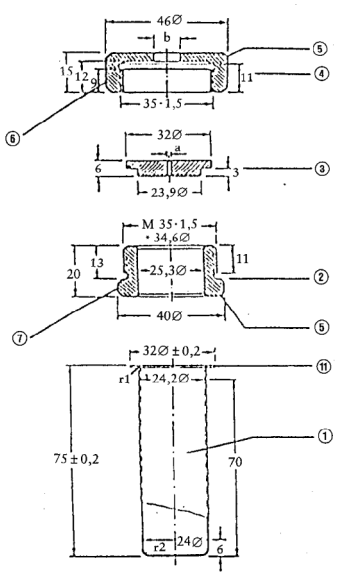
2) Düüsiga plaat: materjalispetsifikatsioon nr 1.4873

3) Keermega võru ja mutter: materjalispetsifikatsioon nr 1.3817

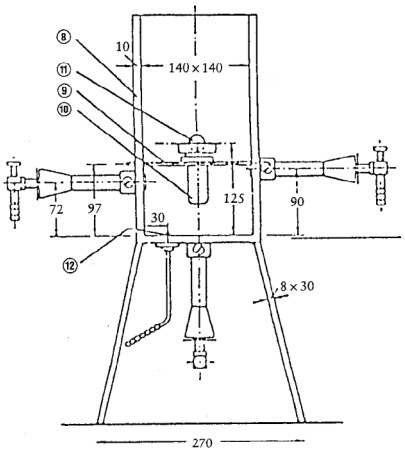
Joonis 1

Termilise tundlikkuse katseseade

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



Joonis 1a. Terashülss ja abivahendid



Joonis 1b. Kaitsev kuumutusseade

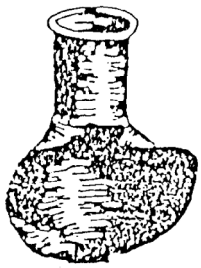
(1) hülss
(1a) välisäärik
(2) keermega võru, madala hõõrduvusega keere
(3) düüsiga plaat, läbimõõt a = 2,0 või 6,0 mm
(4) mutter, läbimõõt b = 10 mm
(5) ümardatud pind
(6) 2 lamedat osa mutrivõtmele nr 41
(7) 2 lamedat osa mutrivõtmele nr 36
(8) killunemiskindel kest
(9) 2 tugivarrast hülsile
(10) komplekteeritud hülss
(11) tagumise põleti asukoht; ülejäänud põletid on nähtaval
(12) süüteleek

▼B

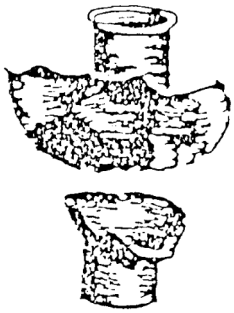
Joonis 2

Termilise tundlikkuse katse

(purunemise näited)



Plahvatuseta purunemine



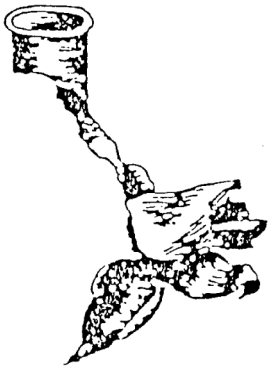
Plahvatuseta purunemine



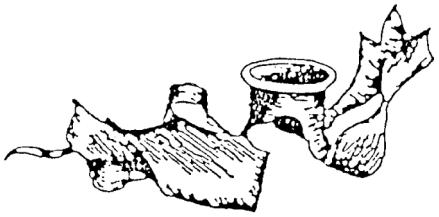
Plahvatusega purunemine



Plahvatusega purunemine



Plahvatusega purunemine

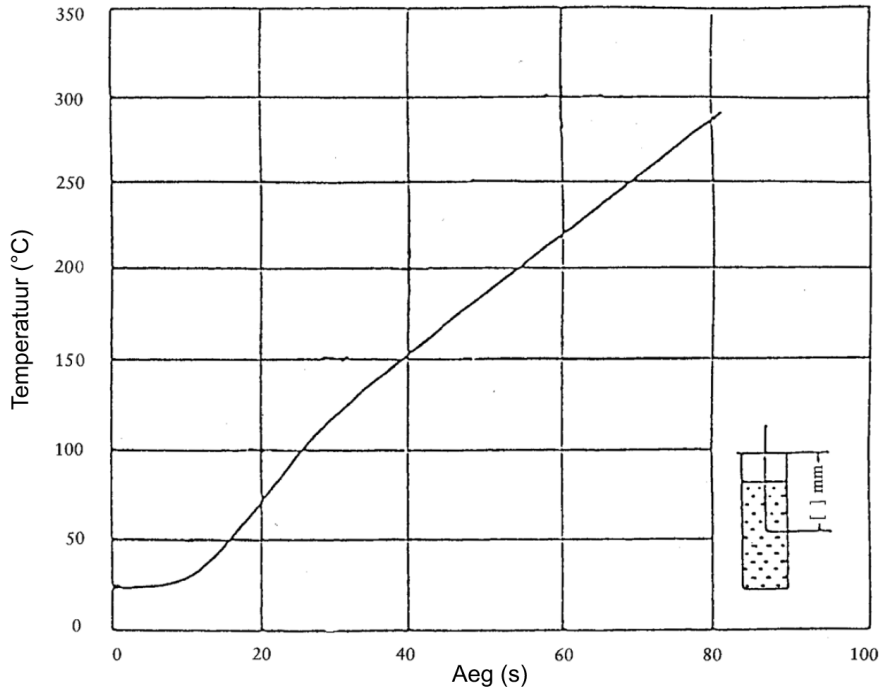


Plahvatusega purunemine

▼B

Joonis 3

Kuumutamiskiiruse kaliibrimine termilise tundlikkuse katseks



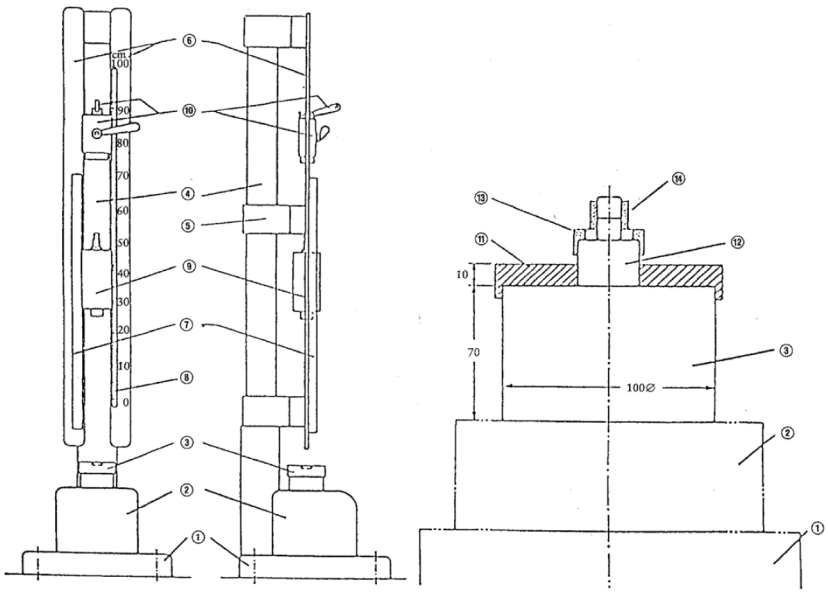
Temperatuuri/aja graafik 27 cm3 dibutüülftalaadi kuumutamisel suletud (1,5 mm düüsiga plaadiga) hülsis propaani voolukiirusel 3,2 l/min. Temperatuur määratakse 1 mm läbimõõduga roostevabast terasest kattega kromellist/alumellist termopaariga, mis on paigutatud mõõteseadme keskele 43 mm allapoole hülsi serva. Kuumutamise kiirus temperatuurivahemikus 135-285 ^{o}C peats olema 185-215 K/min.

▼B

Joonis 4

Löögikatse seade

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



Joonis 4a. Langev vasar eest ja küljelt, üldvaade

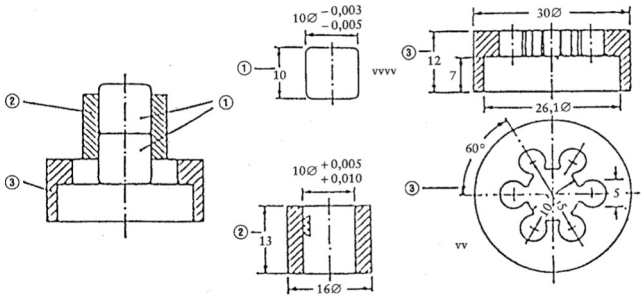
Joonis 4b. Langev vasar, alumine osa

(1) alus, 450 x 450 x 60
(2) terasplokk, 230 x 250 x 200
(3) alasi, 100 (diameeter) x 70
(4) post
(5) keskmine põiktala
(6) 2 juhtrööbast
(7) hammaslatt
(8) jaotistega skaala
(9) langev vasar (langev raskus)
(10) fiksaator/päästikseade
(11) juhtplaat
(12) vahetatav vahealasi, 26 (diameeter) x 26
(13) düüsidega juhtrõngas
(14) löögiseade

▼B

Joonis 4

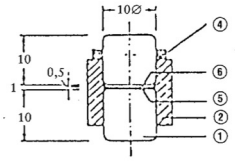
Jätk

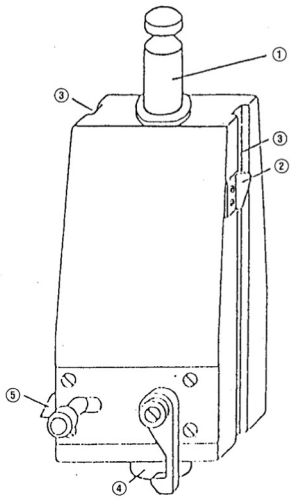


Joonis 4c. Löögiseade pulbriliste või pastataoliste ainete jaoks

Joonis 4d. Löögiseade vedelike jaoks

(1) terassilindrid
(2) terassilindrite juhtvõru
(3) düüsidega juhtrõngas
a) püstsuunaline läbilõige
b) pealtvaade
(4) kummirõngas
(5) vedelik (40 mm^3)
(6) vedelikuvaba ruum





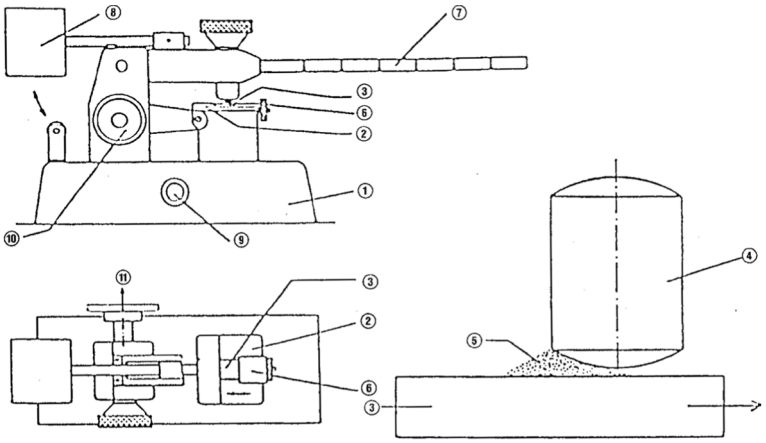
Joonis 4e. Vasar (langev 5 kg raskus)

(1) riputusnagapulk
(2) kõrgusemärgis
(3) fikseeriv soon
(4) silindriline löökpea
(5) tagasikäigukonks

▼B

Joonis 5

Hõõrdetundlikkuse katseseade



Joonis 5a Hõõrdeseade, eestvaade ja pealtvaade

Joonis 5b Pulga algpositsioon proovil

(1) terasalus
(2) liikuv kelk
(3) portselanplaat, 25 × 25 × 5 mm, kelgul
(4) fikseeritud portselanpulk, 10 (diameeter) × 15 mm
(5) uuritav proov, ligikaudu 10 mm^3
(6) pulgahoidja
(7) koormusõlg
(8) vastukaal
(9) lüliti
(10) ratas kelgu algasendisse viimiseks
(11) elektrimootori suund

▼B

A.15. **ISESÜTTIMISTEMPERATUUR (VEDELIKUD JA GAASID)**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Lõhkeaineid ja tavalisel temperatuuril õhuga kokkupuutel süttivaid aineid ei tohiks selles katses uurida. Katsemeetod on kohaldatav gaasidele, vedelikele ja aurudele, mis õhu juuresolekul kuuma pinnaga kokku puutudes süttivad.

Katalüütilised lisandid, pinnamaterjal või katseanuma suurem maht võivad isesüttimistemperatuuri oluliselt alandada.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Isesüttivuse määra väljendatakse isesüttimistemperatuurina. Isesüttimistemperatuur on madalaim temperatuur, mille juures testaine katsemeetodis määratletud tingimustel õhuga segatuna süttib.

1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusained on loetletud standardites (vt 1.6.3). Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Meetodi kohaselt määratakse kambri siseseina minimaalne temperatuur, mis põhjustab kambrisse süstitud gaasi, auru või vedeliku süttimise.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Korratavus varieerub vastavalt isesüttimistemperatuuri vahemikule ja kasutatavale katsemeetodile.

Tundlikkus ja spetsiifilisus sõltuvad kasutatavast katsemeetodist.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Seade**

Katseseadet kirjeldatakse punktis 1.6.3 viidatud meetodis.

1.6.2. **Katsetingimused**

Testaine proovi uuritakse punktis 1.6.3 viidatud meetodi kohaselt.

1.6.3. **Katse tegemine**

Vt IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **ANDMED**

Registreerige katsetemperatuur, atmosfäärirõhk, kasutatud proovikogus ja ajavahemik süttimiseni.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— kasutatud proovikogust ja atmosfäärirõhku;

— kasutatud katseseadet;

— mõõtmistulemusi (katsetemperatuure, süttimistulemusi ja süttimiseni kulunud ajavahemikke);

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

4. **VIITED**

Puuduvad.

▼B

A.16. **TAHKETE AINETE SUHTELINE ISESÜTTIMISTEMPERATUUR**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Lõhkeaineid ja tavalisel temperatuuril õhuga kokkupuutel süttivad aineid ei tohiks selles katses uurida.

Katse annab eelteavet tahkete ainete isesüttivuse kohta kõrgematel temperatuuridel.

Kui aine reaktsioonil hapnikuga või eksotermilisel lagunemisel tekkiv soojus ei haju küllalt kiiresti keskkonda, leiab aset isesüttimiseni viiv isekuumenemine. Seega leiab isesüttimine aset siis, kui soojuse tekkekiirus ületab soojuskao kiiruse.

Katse on kasutatav tahkete ainete esialgse sõelkatsena. Arvestades tahkete ainete süttimis- ja põlemisprotsesside keerukust, tuleks selle katsemeetodi abil leitud isesüttimistemperatuuri kasutada ainult võrdlemiseks.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Selle meetodi abil leitud isesüttimistemperatuur on madalaim temperatuur (^{o}C), mille juures kindel ainekogus määratletud tingimustel süttib.

1.3. VÕRDLUSAINE

Puudub.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritava aine kindlaksmääratud kogus viiakse toatemperatuuril ahju ja registreeritakse temperatuuri/aja kõver proovi keskosas ahju temperatuuri tõstmisel kiirusega 0,5^{o}C/min temperatuurini 400 ^{o}C või aine sulamistemperatuurini, kui viimane on madalam. Käesoleva katse kohaselt loetakse isesüttimistemperatuuriks ahju temperatuur, mille juures proovi temperatuur isekuumenemise tulemusel 400 ^{o}Cni jõuab.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Seade**

1.6.1.1. *Ahi*

Juhitava temperatuuriga laboriahi (mahuga umbes 2 liitrit), millel on loomulik õhuvahetus ja plahvatuskaitseklapp. Vältimaks võimalikku plahvatusohtu, ei tohi eralduvaid lagunemisgaase lasta elektriküttseadmetega kokku puutuda.

▼B

1.6.1.2. *Traatvõrgust kuubik*

Tükk roostevabast terasest traatvõrku 0,045 mm võrgusilmaga lõigatakse välja vastavalt joonisel 1 toodud skeemile. Võrk volditakse kokku ja kinnitatakse traadiga nii, et tekib avatud ülaosaga kuubik.

1.6.1.3. *Termopaarid*

Kasutatakse sobivaid termopaare.

1.6.1.4. *Meerik*

Sobib mis tahes kahe kanaliga meerik, mis on kaliibritud temperatuurivahemikus 0–600 °C või vastavas pingevahemikus.

1.6.2. **Katsetingimused**

Aineid uuritakse töötlemata kujul.

1.6.3. **Katse tegemine**

Kuubik täidetakse uuritava ainega ja koputatakse õrnalt, misjärel lisatakse veel ainet, kuni kuubik on täielikult täidetud. Kuubik riputatakse seejärel toatemperatuuril oleva ahju keskele. Temperatuuri registreerimiseks paigutatakse üks termopaar kuubiku keskele ning teine kuubiku ja ahjuseina vahele.

Ahju ja proovi temperatuur registreeritakse pidevalt ahju temperatuuri tõstmisel kiirusega 0,5°C/min temperatuurini 400 °C või aine sulamistemperatuurini, kui viimane on madalam.

Aine süttimisel näitab proovis olev termopaar temperatuuri järsku tõusu üle ahju temperatuuri.

2. **ANDMED**

Hindamisel on oluline ahju temperatuur, mille juures jõuab proovi temperatuur isekuumenemise tulemusena 400 °Cni (vt joonist 2).

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— uuritava aine kirjeldust;

— mõõtmistulemusi, sh temperatuuri/aja kõverat;

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

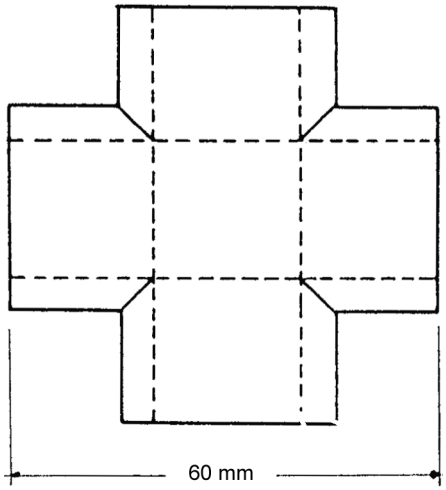
4. **VIITED**

NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

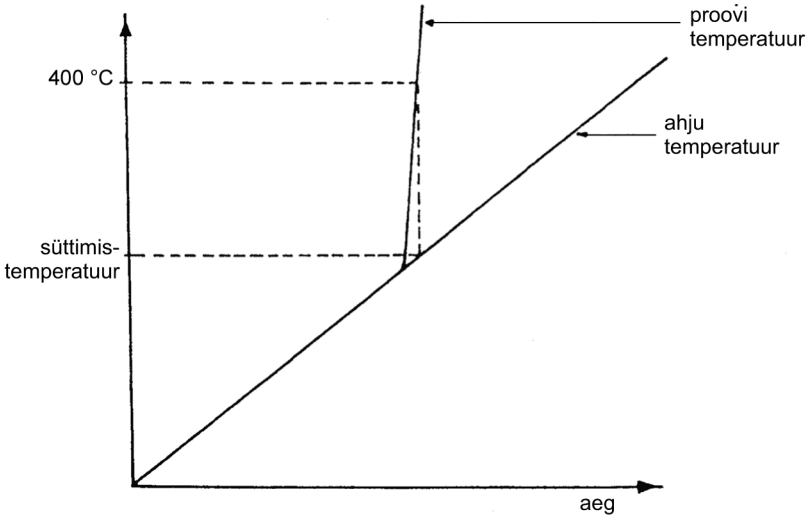
Joonis 1

20 mm katsekuubiku skeem



Joonis 2

Tüüpiline temperatuuri/aja kõver



▼B

A.17. **OKSÜDEERIVAD OMADUSED (TAHKED AINED)**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Katse tegemiseks on kasulik teada aine võimalikku plahvatusohtlikkust.

Katset ei saa kasutada vedelike, gaaside, plahvatusohtlike või väga tuleohtlike ainete ega orgaaniliste peroksiidide puhul.

Katset ei ole vaja teha juhul, kui toimeaine struktuurivalemi kontrollimisel ei jää põhjendatud kahtlust, et toimeaine reageerib põleva materjaliga eksotermiliselt.

Kontrollimaks, kas katse tegemisel tuleks kasutada erilisi ettevaatusabinõusid, tuleks teha eelkatse.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Põlemisaeg: reaktsiooniaeg (sekundites), mis kulub reaktsioonivööndi levikuks piki kuhilat vastavalt punktis 1.6 kirjeldatud protseduurile.

Põlemiskiirus: väljendatakse millimeetrites sekundi kohta.

Suurim põlemiskiirus: suurim põlemiskiiruse väärtus, mis on mõõdetud 10–90 % oksüdeerijasisaldusega (massi järgi) segudes.

1.3. VÕRDLUSAINE

Võrdlusainena kasutatakse nii katses kui ka eelkatses analüüsipuhast baariumnitraati.

Võrdlussegu on selline punkti 1.6 kohaselt valmistatud baariumnitraadi ja pulbertselluloosi segu, millega saavutatakse suurim põlemiskiirus (tavaliselt 60 % baariumnitraadi sisaldusega (massi järgi) segu).

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ohutuse huvides tehakse eelkatse. Kui eelkatse näitab selgelt, et testainel on oksüdeerivad omadused, pole edasine kontrollimine vajalik. Vastupidisel juhul tehakse aine kohta täiemahuline katseprogramm.

Täiemahulises katseprogrammis segatakse uuritavast ainest ja kindlaksmääratud põlevast ainest mitmesugustes vahekordades segusid. Igast segust tehakse seejärel kuhi ja süüdatakse see ühest otsast. Leitud suurimat põlemiskiirust võrreldakse võrdlussegu suurima põlemiskiirusega.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Vajaduse korral võib kasutada mis tahes peenestamis- ja segamismeetodeid eeldusel, et kuues eraldi katses määratud suurimad põlemiskiirused ei erine aritmeetilisest keskmisest rohkem kui 10 %.

▼B

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Ettevalmistused**

1.6.1.1. *Testaine*

Uuritava proovi osakeste suurust vähendatakse järgmisel meetodil alla 0,125 mm: testaine sõelutakse, seejärel peenestatakse sõelale jäänud osa ja korratakse protseduuri senikaua, kuni kogu proov on sõela läbinud.

Kasutada võib kvaliteedinõuetele vastavaid mis tahes peenestamis- ja sõelumismeetodeid.

Enne segu valmistamist kuivatatakse ainet 105 °C juures konstantse massi saavutamiseni. Kui uuritava aine lagunemistemperatuur on alla 105 °C, kuivatatakse aine sobival madalamal temperatuuril.

1.6.1.2. *Põlevaine*

Põlevainena kasutatakse pulbertselluloosi. Tselluloos peaks olema õhukese kihi kromatograafias või kolonnkromatograafias kasutatavat tüüpi. Sobivaks on osutunud tselluloositüüp, mille kiupikkused jäävad 85 % ulatuses vahemikku 0,020–0,075 mm. Tselluloosipulber sõelutakse läbi 0,125 mm avasuurusega sõela. Kogu katse kestel tuleb kasutada samast partiist pärit tselluloosi.

Enne segu valmistamist kuivatatakse pulbertselluloosi 105 °C juures konstantse massi saavutamiseni.

Kui eelkatses kasutatakse puidutolmu, valmistatakse okaspuu puidutolm ette järgmiselt: kogutakse fraktsioon, mis läbib 1,6 mm avasuurusega sõela, segatakse tolm põhjalikult ja kuivatatakse seda neli tundi 105 °C juures kõige rohkem 25 mm paksuses kihis. Tolm jahutatakse ja suletakse kuni kasutamiseni õhukindlalt võimalikult täis mahutisse; soovitatav on tolmu kasutada 24 tunni jooksul kuivatamisest.

1.6.1.3. *Süüteallikas*

Süüteallikana tuleks kasutada vähemalt 5 mm läbimõõduga gaasipõleti kuuma leeki. Muu süüteallika kasutamisel (nt katse tegemisel inertses atmosfääris) tuleks esitada selle kirjeldus ja kasutamise põhjendus.

1.6.2. **Katse tegemine**

Märkus

Oksüdeerijate segusid tselluloosi või puidutolmuga tuleb vaadelda potentsiaalselt plahvatusohtlikuna ja käsitleda nõutava ettevaatusega.

1.6.2.1. *Eelkatse*

Kuivatatud aine segatakse hoolikalt kuivatatud tselluloosi või puidutolmuga vahekorras kaks osa testainet ühe osa tselluloosi või puidutolmu kohta ja tehakse segust väike koonusekujuline kuhi mõõtudega 3,5 cm (aluse läbimõõt) × 2,5 cm (kõrgus), täites selleks ilma tampimata koonusekujulise vormi (nt suletud põhjaga laborilehtri).

▼B

Kuhi asetatakse mittesüttivale, mittepoorsele ja madala soojusjuhtivusega alusplaadile. Katse tehakse tõmbekapis vastavalt kirjeldusele punktis 1.6.2.2.

Süüteallikas viiakse vastu kuhilat. Jälgitakse järgneva reaktsiooni tugevust ja kestust ning see registreeritakse.

Kui reaktsioon on tugev, loetakse aine oksüdeerivaks.

Kui tulemused on kaheldavad, tehakse allpool kirjeldatud täiemahuline katseprogramm põlemisribaga.

1.6.2.2. *Põlemisribakatse*

Valmistatakse 10 % kaupa kasvava oksüdeerijasisaldusega oksüdeerija/tselluloosi segud, mis sisaldavad 10–90 % oksüdeerijat (massi järgi). Piiripealsetel juhtudel tuleks suurima põlemiskiiruse täpsemaks mõõtmiseks kasutada vahepealsete kontsentratsioonidega oksüdeerija/tselluloosi segusid.

Kuhi tekitatakse vormi abil. Vorm on metallist, 250 mm pikk ja kolmnurkse läbilõikega, 10 mm sisemise kõrguse ja 20 mm sisemise laiusega. Vormi kummalegi küljele paigaldatakse pikisuunas külgpiireteks kaks metallplaati, mis ulatuvad 2 mm üle kolmnurkse vao ülemise ääre (vt joonist). Seade täidetakse mõningases liias seguga, ilma seda tihendamata. Vorm kukutatakse seejärel 2 cm kõrguselt tugevale aluspinnale ja allesjäänud üleliigne aine tõmmatakse viltuse paberilehega pealt ära. Külgmised piirded eemaldatakse ja allesjäänud pulbrit silutakse rulliga. Vormi peale paigaldatakse seejärel mittesüttiv, mittepoorne ja madala soojusjuhtivusega alusplaat, keeratakse vorm koos plaadiga ümber ja vorm eemaldatakse.

Riba paigutatakse tõmbekapi alla õhu liikumise suunaga risti.

Õhu liikumiskiirus peab olema piisav, et takistada suitsu levikut laborisse, ning seda tuleb katse jooksul konstantsena hoida. Seadme ümber tuleks paigaldada tõmbevari.

Tselluloosi ja mõnede uuritavate ainete hügroskoopsuse tõttu tuleb katse teha võimalikult kiiresti.

Riba üks ots süüdatakse leegi abil.

Pärast seda, kui reaktsioonivöönd on levinud esimesed 30 mm, mõõdetakse järgneva 200 mm ulatuses reaktsiooni leviku aeg.

Katse tehakse võrdlusainega ja vähemalt korra kõigi testaine/tselluloosi segudega.

Kui leitav suurim põlemiskiirus ületab oluliselt võrdlussegu põlemiskiirust, võib katse peatada; muul juhul korratakse katset viis korda, kasutades kolme suurima põlemiskiirusega segu.

▼B

Kui arvatakse, et positiivne tulemus on ekslik, korratakse katset sama suurte osakestega inertse ainega, näiteks diatomiidiga tselluloosi asemel. Katset võib korrata ka kõrgeima põlemiskiirusega testaine/tselluloosi seguga inertses atmosfääris (hapnikusisaldus < 2 % mahu järgi).

2. **ANDMED**

Ohutuse huvides loetakse uuritava aine oksüdeerivaid omadusi iseloomustavaks suuruseks suurim põlemiskiirus, mitte selle keskmine väärtus.

Hindamise seisukohast on oluline antud seguga kuuest katsest koosnevas seerias saadud suurim põlemiskiiruse väärtus.

Koostatakse graafik, mis näitab iga segu põlemiskiiruse suurima väärtuse sõltuvust oksüdeerija kontsentratsioonist. Graafikult loetakse suurim põlemiskiirus.

Kuus ühes katses suurima põlemiskiirusega segu mõõtmisel saadud põlemiskiiruse väärtust ei tohi aritmeetilisest keskmisest erineda rohkem kui 10 %, vastasel korral tuleb peenestamis- ja segamismeetodeid täiustada.

Leitud suurimat põlemiskiirust võrreldakse võrdlussegu suurima põlemiskiirusega (vt 1.3).

Kui katse tehakse inertses atmosfääris, võrreldakse suurimat reaktsioonikiirust võrdlussegu vastava näitajaga inertses atmosfääris.

3. **ARUANNE**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— testaine tunnusandmeid, koostist, puhtusastet, niiskusesisaldust jne;

— proovi mis tahes käitlemist (nt peenestamist, kuivatamist jne);

— katsetes kasutatud süüteallikat;

— mõõtmiste tulemusi;

— reaktsiooni tüüpi (nt kiire põlemine pinnal, põlemine kogu massis, mis tahes andmeid põlemissaaduste kohta jne);

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid märkusi, sh eelkatses test- ja võrdlusainega tekkinud reaktsiooni tugevuse kohta (leegiga, sädemetega, suitsuga, hõõgumisega reaktsioon jne) ning nii test- kui ka võrdlusaine puhul eelkatses/sõelkatses kulunud aega;

— inertse ainega tehtud katsete tulemusi, kui neid tehti;

— inertses atmosfääris tehtud katsete tulemusi, kui neid tehti.

▼B

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Aine loetakse oksüdeerivaks, kui

a) eelkatses ilmneb tugev reaktsioon;

b) uuritavate segude suurim täiemahulises katseprogrammis leitud põlemiskiirus on suurem tselluloosist ja baariumnitraadist valmistatud võrdlussegu suurimast põlemiskiirusest või sellega võrdne.

Ekslike positiivsete tulemuste vältimiseks tuleks tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta ka aine inertse materjaliga segamisel ja/või inertses atmosfääris tehtud katsete tulemusi.

4. **VIITED**

NF T 20-035 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

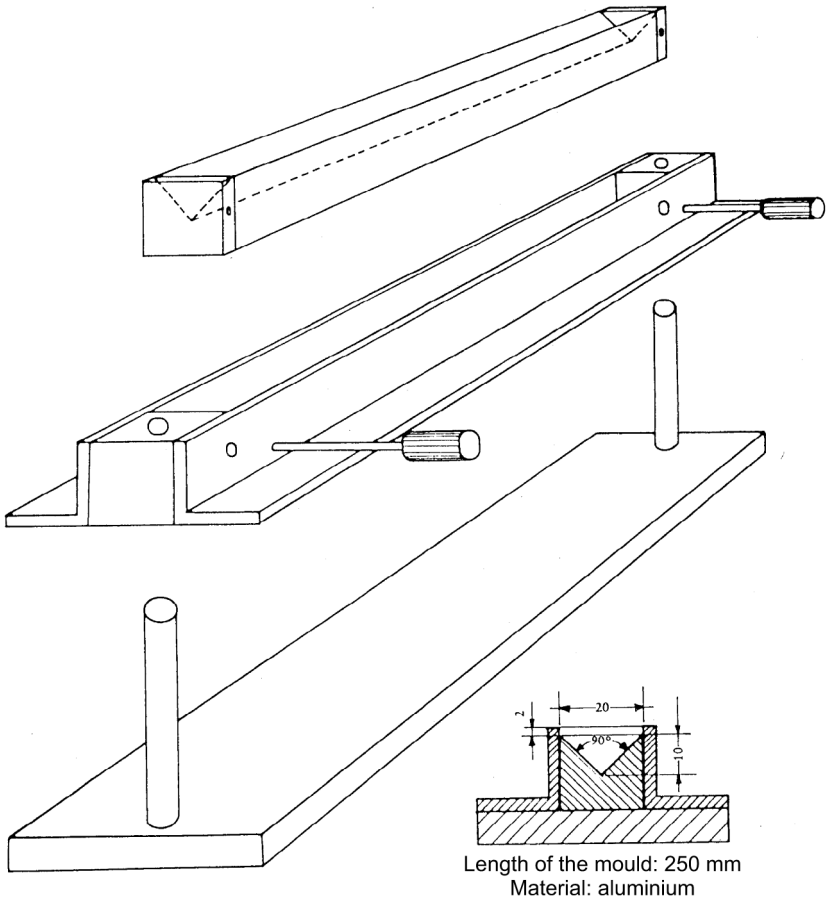
▼B

Liide

Joonis

Vorm ja abivahendid põlemisriba valmistamiseks

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



▼B

A.18. **POLÜMEERIDE ARVKESKMINE MOLEKULMASS JA MOLEKULMASSIDE JAOTUS**

1. **MEETOD**

Käesolev geelkromatograafia (GPC) meetod on OECD katsejuhendi nr 118 (1996) koopia. Meetodi põhimõte ja tehniline lisateave on toodud kirjandusviites 1.

1.1. SISSEJUHATUS

Kuna polümeeride omadused on väga erinevad, siis on võimatu kirjeldada ühtainust meetodit, mis kirjeldaks täpselt eraldamis- ja analüüsitingimusi, mis kataks kõiki polümeeride eraldamisel esinevaid võimalikke juhtumeid ja olukordi. Eelkõige on keeruliste polümeerisegude lahutamine geelkromatograafia abil sageli võimatu. Kui geelkromatograafia ei ole kasutatav, siis võib molekulmassi määramiseks kasutada teisi meetodeid (vt lisa). Sellistel juhtudel tuleb kasutatava meetodi kohta esitada kõik üksikasjad ja põhjendused.

Kirjeldatav meetod põhineb standardil DIN 55672 (1). Üksikasjalik teave katsete tegemiseks ja andmete hindamiseks on toodud nimetatud DIN standardis. Kui katse tingimuste muutmine osutub vajalikuks, siis peab vastavaid muudatusi põhjendama. Muude standardite kasutamisel peab nende jaoks andma täielikud viited. Kirjeldatava meetodi kalibreerimiseks kasutatakse teadaoleva polüdisperssusega polüstüreeni proove ja teatud polümeeride (näiteks vesilahustuvad ja pika ahelaga hargnenud polümeerid) analüüsimiseks võib osutuda vajalikuks meetodis muudatuste tegemine.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Arvkeskmise molekulmassi M_n ja masskeskmise molekulmassi M_w arvutamiseks kasutatakse järgmisi valemeid:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kus

H_i on detektori signaali kõrgus mõõdetuna baasjoonelt retentsiooniruumala V_i jaoks,

M_i on retentsiooniruumalale V_i vastava polümeerifraktsiooni molekulmass ja

n on mõõtepunktide arv.

Molekulmassi jaotuse ulatus, mis iseloomustab segu disperssust, leitakse M_w/M_n suhtest.

▼B

1.3. VÕRDLUSAINED

Kuna geelkromatograafia on suhteline meetod, siis peab seda kalibreerima. Selleks otstarbeks kasutatakse tavaliselt kitsa fraktsioonilise jaotusega lineaarseid polüstüreenistandardeid, mille keskmised molekulmassid M_n ja M_w ning molekulmasside jaotus on teada. Kalibreerimiskõverat võib kasutada tundmatu proovi molekulmassi määramiseks vaid siis, kui proovi ja standardi lahutamiseks kasutatavad tingimused on valitud ühesuguselt.

Molekulmassi ja elueerunud ruumala vaheline suhe on õige vaid konkreetsele katsele iseloomulikel tingimustel. Nimetatud tingimused hõlmavad eelkõige temperatuuri, lahustit (või lahustite segu), kromatograafilisi tingimusi ja kasutatavat kolonni või kolonnisüsteemi.

Sellisel viisil proovist määratud molekulmassid on suhtelised ja neid nimetatakse „polüstüreeniekvivalendi molekulmassideks”. See tähendab, et sõltuvalt proovi ja standardi vahelistest struktuurilistest ja keemilistest erinevustest võivad molekulmassid hälbida absoluutsetest väärtustest rohkemal või vähemal määral. Juhul kui kasutatakse teisi standardeid, näiteks polüetüleenglükool, polüetüleenoksiid, polümetüül metakrülaat, polüakrüülhape, siis peab seda põhjendama.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Geelkromatograafia abil võib määrata nii proovi molekulmassi jaotust kui ka keskmisi molekulmasse (M_n, M_w). Geelkromatograafia on spetsiaalne vedelikkromatograafia liik, milles proov lahutatakse üksikute koostisosade hüdrodünaamiliste ruumalade järgi (2).

Lahutamiseks juhitakse proov läbi poorse materjaliga, tavaliselt orgaanilise geeliga, täidetud kolonni. Väikesed molekulid suudavad tungida pooridesse, kuhu suurte molekulide juurdepääs on takistatud. Seetõttu on suurte molekulide teepikkus lühem ja nad elueeruvad kiiremini. Keskmise suurusega molekulid tungivad osadesse pooridesse, mistõttu nad elueeruvad mõnevõrra aeglasemalt. Kõige väiksemad molekulid, mille keskmine hüdrodünaamiline raadius on väiksem kui geeli poorid, tungivad kõikidesse pooridesse ja elueeruvad viimastena.

Ideaaljuhul mõjutab lahutamist ainult molekulide suurus, kuid praktikas on raske vältida vähemalt mõningaid adsorptsioonist tingitud segavaid mõjusid. Kolonni ebaühtlane täitematerjal ja suurem omaruumala võivad olukorda halvendada (2).

Detekteerimiseks kasutatakse näiteks refraktsiooni indeksit või UV-absorptsiooni ja tulemuseks saadakse lihtne jaotuskõver. Selleks, et omistada saadud kõverale tegelikke molekulmassi väärtusi, tuleb kolonni kalibreerida teadaolevate molekulmassidega ja ideaaljuhul üldjoontes sarnase struktuuriga polümeeridega, näiteks erinevad polüstüreenistandardid. Tüüpiliselt saadakse Gaussi kõver, mis on mõnikord madalate molekulmasside osas väljaveninud sabaga, kusjuures vertikaalsel teljel on elueerunud erinevate molekulmassiga ühendite kogus massi järgi ja horisontaalsel teljel on logaritmilises skaalas molekulmass.

▼B

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Elutsiooniruumala korratavus (suhteline standardhälve, RSD) peaks olema parem kui 0,3 %. Kui kromatogrammi hinnatakse ajalise sõltuvuse põhjal ja see ei vasta ülaltoodud kriteeriumitele, tagatakse nõutav analüüsikorratavus sisestandardi kasutamisega (1). Polüdisperssused sõltuvad standardite molekulmassidest. Polüstüreenistandardite kasutamisel on tüüpilised väärtused järgmised:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p on piigi maksimumile vastav standardi molekulmass)

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Polüstüreeni standardlahuste valmistamine**

Polüstüreenistandardid lahustatakse ettevaatlikul segamisel valitud eluendiga. Lahuste valmistamisel peab arvestama tootja soovitusi.

Valitud standardi kontsentratsioonid sõltuvad mitmetest erinevatest teguritest, näiteks süsteruumala, lahuse viskoossus ja analüütilise detektori tundlikkus. Maksimaalset süsteruumala peab kohandama vastavalt kolonni pikkusele, et vältida kolonni ülelaadimist. Geelkromatograafia analüütiliste meetodite korral jäävad tüüpilised süsteruumalad vahemikku 40 kuni 100 µl, kui kolonni mõõdud on 30 cm × 7,8 mm. Võimalik on kasutada ka suuremaid ruumalasid, kuid need ei tohiks ületada 250 µl. Enne kolonni tegelikku kalibreerimist tuleb kindlaks teha süsteruumala ja kontsentratsiooni vaheline optimaalne suhe.

1.6.2. **Proovilahuse valmistamine**

Põhimõtteliselt kehtivad ülaltoodud nõudsed ka proovilahuste valmistamisel. Proov lahustatakse sobivas lahustis, näiteks tetrahüdrofuraanis (THF), ettevaatlikul loksutamisel. Mitte mingil juhul ei tohi lahustamiseks kasutada ultrahelivanni. Vajaduse korral puhastatakse proovi lahust membraanfiltriga, mille pooride suurus on 0,2 kuni 2 µm.

Lahustumatute osakeste olemasolu peab ära märkima ka lõplikus aruandes, kuna see võib olla tingitud kõrge molekulmassiga ühenditest. Lahustunud osakeste massiprotsendi määramiseks peab kasutama sobivat meetodit. Valmistatud lahuseid peab kasutama 24 tunni jooksul.

1.6.3. **Seadmed**

— mahuti lahustile;

— degaseerija (vajaduse korral);

— pump;

▼B

— pulsatsioonisummuti (vajaduse korral);

— injektsioonisüsteem;

— kromatograafilised kolonnid;

— detektor;

— kulumõõtja (vajaduse korral);

— andmesalvesti ja -töötleja;

— nõu jääkide jaoks.

Enne peab kindlaks tegema, et geelkromatograafia süsteem oleks kasutatavate lahustite suhtes inertne (näiteks tetrahüdrofuraani jaoks kasutada teraskapillaare).

1.6.4. **Injektsiooni ja lahusti etteandmise süsteem**

Proovilahuse etteantud kogus sisestatakse automaatse injektoriga või käsitsi täpselt kindlaks määratud kolonni piirkonda. Käsitsi injektsiooni korral võib süstla kolvi liiga kiire tagasitõmbamine või vabastamine põhjustada muutusi mõõdetava molekulmassi jaotuses. Lahusti etteandmise süsteem peaks olema võimalikult pulseerimisvaba, sisaldades ideaaljuhul pulsatsioonisummutit. Voolukiirus on suurusjärgus 1 ml/min.

1.6.5. **Kolonn**

Sõltuvalt proovist kasutatakse polümeeri analüüsiks kas ühte lihtsat kolonni või mitut järjestikku ühendatud kolonni. Kolonni täitematerjalidena on kaubanduslikult kättesaadavad paljud poorsed kindlate omadustega ained (näiteks poori suurus, eksklusioonipiirid). Lahutamiseks kasutatava geeli või kolonni pikkuse valik sõltub nii proovi omadustest (hüdrodünaamiline ruumala, molekulmasside jaotus) kui ka spetsiifilistest lahutamistingimustest, näiteks lahusti, temperatuur ja voolukiirus (1, 2, 3).

1.6.6. **Teoreetilised taldrikud**

Lahutamiseks kasutatavat kolonni või kolonnide süsteemi iseloomustatakse teoreetiliste taldrikute arvuga. Tetrahüdrofuraani kasutamisel eluendina hinnatakse seda etüülbenseeni või mõne muu sobiva mittepolaarse lahustunud aine (soluudi) laadimisel teadaoleva pikkusega kolonni. Teoreetiliste taldrikute arv saadakse järgmiste valemite põhjal:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{või} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

kus

N = teoreetiliste taldrikute arv

V_e = piigi maksimumile vastav elutsiooniruumala

▼B

W = piigi laius baasjoonel

$W_{1/2}$ = piigi laius poolel piigi kõrgusel

1.6.7. **Lahutamise efektiivsus**

Lisaks ribalaiust määravale teoreetiliste taldrikute arvule on tähtis ka lahutamise efektiivsus, mis sõltub sellest, kui järsk on kalibreerimiskõvera tõus. Kolonni lahutamisefektiivsus saadakse järgmisest valemist:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{kolonni ristlõikepindala}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kus

$V_{e,\ M_x}$ = polüstüreeni molekulmassiga M_x elutsiooniruumala

$V_{e,(10.M_x)}$ = kümme korda suurema molekulmassiga polüstüreeni elutsiooniruumala

Süsteemi lahutusvõime defineeritakse tavaliselt järgmiselt:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kus

V_{e1}, V_{e2} = kahe polüstüreenistandardi elutsiooniruumalad piigi maksimumil

W_1, W_2 = piigi laiused baasjoonel

M_1, M_2 = piigi maksimumile vastavad molekulmassid (peaksid erinema kümme korda)

Kolonnisüsteemi R-väärtus peaks olema suurem kui 1,7 (4).

1.6.8. **Lahustid**

Kõik lahustid peavad olema kõrge puhtusastmega (kasutatava tetrahüdrofuraani puhtus on 99,5 %). Lahusti mahuti (vajaduse korral paigutatud inertgaasi atmosfääri) peab olema piisavalt suur, et võimaldada kolonni kalibreerimist ja proovide analüüsi. Enne pumpamist kolonni peab lahustit degaseerima.

1.6.9. **Temperatuurikontroll**

Kriitilise tähtsusega komponentide (injektsioonisilmus, kolonnid, detektor ja torustik) temperatuur peab olema konstantne ja sobima kasutatavale lahustile.

▼B

1.6.10. **Detektor**

Detektori eesmärk on kolonnist elueeruva proovi kontsentratsiooni kvantitatiivne mõõtmine. Selleks, et vältida piikide tarbetut laienemist, peab detektori mõõteraku küveti ruumala olema võimalikult väike. See ei tohiks olla suurem kui 10 µl, välja arvatud valguse hajuvust ja viskoossust mõõtvate detektorite korral. Detekteerimiseks kasutatakse tavaliselt diferentsiaalrefraktomeetriat. Tingituna proovi või eluendi spetsiifilistest omadustest võib kasutada ka muid detektsioonimeetodeid, näiteks UV/VIS, IR, viskoossusdetektorid jms.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

2.1. ANDMED

Hindamiskriteeriumitele ning andmete kogumisele ja töötlemisele esitatavate üksikasjaliste nõuete osas peaks järgima DIN standardit (1).

Iga proovi jaoks peab tegema kaks teineteisest sõltumatut katset. Neid katseid peab eraldi analüüsima.

Iga mõõtmise tulemused peavad hõlmama M_n, M_w, M_w/M_n ja M_p väärtusi. Üheselt mõistetavalt peab näitama, et mõõdetud väärtused on suhtelised väärtused, mis on ekvivalentsed kasutatud standardi molekulmassidega.

Pärast retentsiooniruumalade või -aegade kindlaksmääramist (mida võib parandada sisestandardite kasutamisega) esitatakse log M_p väärtused (kus M_p on kalibreerimiseks kasutatava standardi piigi maksimum) ühe eeltoodud suuruse funktsioonina. Molekulmassi dekaadi (kümnekordse vahemiku) kohta on vaja vähemalt kahte kalibreerimiskõvera punkti ja terve kõvera jaoks on vaja vähemalt viit mõõtepunkti, mis peaks hinnanguliselt katma proovi molekulmassi. Kalibreerimiskõvera madala molekulmassiga osa lõpp-punkt määratakse kindlaks n-heksüülbenseeni või muu sobiva mittepolaarse soluudi abil. Arvkeskmised ja masskeskmised molekulmassid arvutatakse tavaliselt elektroonilise andmetöötlusega, mis põhineb punktis 1.2 toodud valemitel. Käsitsi digitaliseerimise kasutamisel võib eeskujuks võtta standardi ASTM D 3536-91 (3).

Jaotuskõvera peab esitama tabeli või joonise kujul (diferentsiaalne sagedus või protsentide summa log M funktsioonina). Graafilisel kujutamisel peab üks molekulmassi kümnekordne vahemik olema umbes 4 cm laiune ja piigi maksimum peab olema umbkaudu 8 cm kõrgune. Integraalsete jaotuskõverate korral peab ordinaadi 0 ja 100 % vahemik olema umbes 10 cm laiune.

2.2. ARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. **Katsetatav aine**

— Olemasolev teave analüüsitava aine kohta (identifitseerimiskood, lisandid, ebapuhtused).

▼B

— Proovi eeltöötluse täpne kirjeldus, tähelepanekud, probleemid.

2.2.2. **Seadmed**

— Eluendi mahuti, inertgaas, eluendi degaseerimine, eluendi koostis, ebapuhtused.

— Pump, pulsatsioonisummuti, injektsioonisüsteem.

— Lahutuskolonnid (tootja, kõik kolonni näitajad, nagu poori suurus, täitematerjali liik jms, kasutatavate kolonnide arv, pikkus ja järjekord).

— Kolonni (või nende kombinatsiooni) teoreetiliste taldrikute arv, lahutamise efektiivsus (süsteemi lahutusvõime).

— Andmed piikide sümmeetria kohta.

— Kolonni temperatuur, temperatuurikontrolli liik.

— Detektor (mõõtmise põhimõte, tüüp, küveti ruumala).

— Kulumõõtja, kui kasutati (tootja, mõõtmispõhimõte).

— Andmete salvestamise ja töötlemise süsteem (riist- ja tarkvara).

2.2.3. **Süsteemi kalibreerimine**

— Kalibreerimiskõvera koostamiseks kasutatud meetodi täpne kirjeldus.

— Andmed selle meetodi kvaliteedikriteeriumite kohta (näiteks korrelatsioonikoefitsient, ruutsumma viga jms).

— Andmed kõikide ekstrapoleerimiste, oletuste ja lähenduste kohta, mis tehti eksperimendi ning andmete hindamise ja töötlemise käigus;

— Kõik kalibreerimiskõvera koostamiseks tehtud mõõtmised peavad olema dokumenteeritud tabelis, mis sisaldab kalibreerimiskõvera iga punkti kohta alljärgnevat teavet:

  — proovi nimetus;

  — proovi tootja;

  — tootjapoolsed või mõõtmistel saadud standardit iseloomustavad M_p, M_n, M_w ja M_w/M_n väärtused koos määramismeetodi üksikasjadega;

  — süsteruumala ja -kontsentratsioon;

▼B

— kalibreerimisel kasutatud M_p väärtus;

— piigi maksimumile vastav mõõdetud elutsiooniruumala või parandatud retentsiooniaeg;

— piigi maksimumile arvutatud M_p;

— arvutatud M_p protsentuaalne viga ja kalibreerimistulemus.

2.2.4. **Hindamine**

1) Aja põhjal hindamine: nõutava korratavuse tagamiseks kasutatavad meetodid (parandusmeetod, sisestandard jms).

2) Teave selle kohta, kas hindamine viidi läbi elutsiooniruumala või retentsiooniaja põhjal.

3) Teave hindamise piiratuse kohta, kui piik ei ole täielikult analüüsitud.

4) Silumismeetodite kirjeldus, kui neid kasutati.

5) Proovi ettevalmistamise ja eeltöötluse protseduurid.

6) Lahustumatute osakeste olemasolu.

7) Süsteruumala (µl) ja -kontsentratsioon (mg/ml).

8) Tähelepanekud seikade kohta, mis võivad põhjustada kõrvalekaldumist ideaalsest geelkromatograafia profiilist.

9) Kõikide katseprotseduurides tehtud muudatuste üksikasjalik kirjeldus.

— Veapiiride üksikasjalikud andmed.

— Mis tahes muu teave ja tähelepanekud, mis puudutavad tulemuste tõlgendamist.

3. **VIITED**

1. DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2. Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3. ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Liide

Näited muudest meetoditest, mida kasutatakse polümeeride arvkeskmise molekulmassi (M_n) määramisel

Geelkromatograafia (GPC) on eelistatud meetod M_n määramiseks, eriti juhul, kui kättesaadav on standardite kogum, mille struktuur on võrreldav uuritava polümeeri struktuuriga. Kui geelkromatograafia kasutamisel on praktilist laadi raskused või olemasolevate andmete põhjal võib eeldada, et uuritav aine ei vasta esitatavatele M_n kriteeriumitele (vajab eelnevalt kinnitamist), siis on võimalik kasutada alternatiivseid meetodeid, näiteks järgmisi.

1. **Kolligatiivsete omaduste kasutamine**

1.1. Ebullioskoopia/krüoskoopia

Hõlmab lahusti keemistemperatuuri tõusu (ebullioskoopia) või külmumistemperatuuri alanemise (krüoskoopia) mõõtmist pärast polümeeri lisamist. Meetod põhineb sellel, et lahustunud polümeeri mõju keemis- või külmumistemperatuurile sõltub polümeeri molekulmassist (1, 2).

Rakendatavus: $M_n < 20\,000$.

1.2. Aururõhu alandamine

Hõlmab valitud võrdlusvedeliku aururõhu mõõtmist enne ja pärast teadaoleva koguse polümeeri lisamist (1, 2).

Rakendatavus: $M_n < 20\,000$ (teoreetiliselt; praktikas siiski piiratud).

1.3. Membraanosmomeetria

Põhineb osmoosi põhimõttel, st tasakaalu saavutamiseks läbivad lahusti molekulid poolläbilaskvat membraani lahjemast lahusest kontsentreeritumasse lahusesse. Katses kasutatav lahja lahus on nullkontsentratsiooniga ja kontsentreeritud lahus sisaldab polümeeri. Läbi membraani tungiv lahusti tekitab rõhkude erinevuse, mis sõltub polümeeri kontsentratsioonist ja molekulmassist (1, 3, 4).

Rakendatavus: M_n vahemikus 20 000 – 200 000.

1.4. Aurufaasi osmomeetria

Hõlmab puhta lahusti aerosooli aurustumiskiiruse võrdlemist vähemalt kolme aerosooliga, mis sisaldavad uuritava polümeeri erinevaid kontsentratsioone (1, 2, 4).

Rakendatavus: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Lõpprühma alüüs**

Selle meetodi kasutamiseks on vajalik teada nii polümeeri üldist struktuuri kui ka ahela otsmiste rühmade keemilist koostist (mis peab olema eristatav põhiahelast näiteks NMR või tiitrimise/derivatiseerimise abil). Polümeeris esinevate otsmiste rühmade molekulaarse kontsentratsiooni määramise kaudu saab leida molekulmassi (7, 8, 9).

Rakendatavus: M_n kuni 50 000 (kahaneva usaldusväärsusega).

3. **Viited**

1. Billmeyer, F. W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

2. Glover, C. A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P. E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

3. ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determinition of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Menbrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A. R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25 to 52.

5. ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

6. Morris, C. E. M., (1989). Vapour Pressure Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A. R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

7. Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

8. Garmon, R. G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P. E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

9. Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **MADALAMOLEKULAARSETE AINETE SISALDUS POLÜMEERIS**

1. **MEETOD**

Käesolev geelkromatograafia (GPC) meetod on OECD katsejuhendi nr 119 (1996) koopia. Meetodi põhimõte ja tehniline lisateave on toodud kirjandusviidetes.

1.1. SISSEJUHATUS

Kuna polümeeride omadused on väga erinevad, siis on võimatu kirjeldada ühtainust meetodit, mille lahutamis- ja analüüsitingimused katavad kõiki polümeeride eraldamisel esinevaid võimalikke juhtumeid ja iseärasusi. Sageli ei ole keeruliste polümeerisegude koostisosadeks lahutamine geelkromatograafiaga võimalik. Kui geelkromatograafia ei ole kasutatav, siis võib molekulmassi määramiseks kasutada teisi meetodeid (vt lisa). Sellistel juhtudel tuleb kasutatava meetodi kohta esitada kõik üksikasjad ja põhjendused.

Kirjeldatav meetod põhineb standardil DIN 55672 (1). Üksikasjalik teave katsete tegemiseks ja andmete hindamiseks on toodud nimetatud DIN standardis. Kui katse tingimuste muutmine osutub vajalikuks, siis peab vastavaid muudatusi põhjendama. Kasutada võib ka muid standardeid, kui neile antakse täielikud viited. Kirjeldatava meetodi kalibreerimiseks kasutatakse teadaoleva polüdisperssusega polüstüreenproove ja teatud polümeeride (näiteks vesilahustuvad ja pika ahelaga hargnenud polümeerid) analüüsil võib osutuda vajalikuks meetodi muutmine.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Madal molekulmass on kokkuleppeliselt molekulmass, mis on väiksem kui 1 000 daltonit.

Arvkeskmise molekulmassi M_n ja masskeskmise molekulmassi M_w arvutamiseks kasutatakse järgmisi valemeid:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kus

H_i = on detektori signaali kõrgus mõõdetuna baasjoonelt retentsioonimahu V_i jaoks

M_i = on retentsioonimahule V_i vastava polümeerifraktsiooni molekulmass ja n on mõõtepunktide arv

Molekulmassi jaotuse laius, mis iseloomustab segu disperssust, saadakse M_w/M_n suhtest.

▼B

1.3. VÕRDLUSAINED

Kuna geelkromatograafia on suhteline meetod, siis peab seda kalibreerima. Selleks otstarbeks kasutatakse tavaliselt kitsa fraktsioonilise jaotusega lineaarseid polüstüreenstandardeid, mille keskmised molekulmassid M_n ja M_w ja molekulmasside jaotus on teada. Kalibreerimiskõverat võib kasutada tundmatu proovi molekulmassi määramiseks vaid siis, kui proovi ja standardi lahutamiseks kasutatavad tingimused on valitud ühtviisi.

Molekulmassi ja elueerunud ruumala vaheline suhe on õige vaid konkreetsele katsele iseloomulikel tingimustel. Nimetatud tingimused hõlmavad eelkõige temperatuuri, lahustit (või lahustite segu), kromatograafilisi tingimusi ja kasutatavat kolonni või kolonnisüsteemi.

Sellisel viisil proovist määratud molekulmassid on suhtelised ja neid nimetatakse „polüstüreeniekvivalendi molekulmassideks”. See tähendab, et sõltuvalt proovi ja standardi vahelistest struktuurilistest ja keemilistest erinevustest võivad molekulmassid hälbida absoluutsetest väärtustest rohkemal või vähemal määral. Juhul kui kasutatakse teisi standardeid, näiteks polüetüleenglükool, polüetüleenoksiid, polümetüülmetakrülaat, polüakrüülhape, siis peab seda põhjendama.

1.4. KATSE MEETODI PÕHIMÕTE

Geelkromatograafiaga võib määrata nii proovi molekulmassi jaotust kui ka keskmisi molekulmasse (M_n, M_w). Geelkromatograafia on spetsiaalne vedelikkromatograafia liik, milles proov lahutatakse üksikute koostisosade hüdrodünaamiliste ruumalade järgi (2).

Lahutamiseks juhitakse proov läbi poorse materjaliga, tavaliselt orgaanilise geeliga, täidetud kolonni. Väikesed molekulid suudavad tungida pooridesse, kuhu suurte molekulide juurdepääs on takistatud. Seetõttu on suurte molekulide teepikkus lühem ja nad elueeruvad kiiremini. Keskmise suurusega molekulid tungivad osadesse pooridesse, mistõttu nad elueeruvad mõnevõrra aeglasemalt. Kõige väiksemad molekulid, mille keskmine hüdrodünaamiline raadius on väiksem kui geeli poorid, tungivad kõikidesse pooridesse ja elueeruvad viimastena.

Ideaaljuhul mõjutab lahutamist ainult molekulide suurus, kuid praktikas on raske vältida vähemalt mõningaid adsorptsioonist tingitud segavaid mõjusid. Kolonni ebaühtlane täitematerjal ja suurem omaruumala võivad olukorda halvendada (2).

Detekteerimiseks kasutatakse näiteks refraktsiooni indeksit või UV-absorptsiooni ja tulemuseks saadakse lihtne jaotuskõver. Selleks, et omistada saadud kõverale tegelikke molekulmassi väärtusi, tuleb kolonni kalibreerida teadaolevate molekulmassidega ja ideaaljuhul üldjoontes sarnase struktuuriga polümeeridega, näiteks erinevad polüstüreenstandardid. Tüüpiliselt saadakse Gaussi kõver, mis on mõnikord madalate molekulmasside osas väljaveninud sabaga, kusjuures vertikaalsel teljel on elueerunud erinevate molekulmassiga ühendite kogus massi järgi ja horisontaalsel teljel on logaritmilises skaalas molekulmass.

▼B

Nimetatud kõveralt saadakse madalmolekulaarsete ainete sisaldus. Arvutused saavad olla täpsed vaid siis, kui madala molekulmassiga ühendid annavad massi alusel detektorile samase signaali kui kogu polümeer.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Elutsiooniruumala korratavus (suhteline standardhälve, RSD) peaks olema parem kui 0,3 %. Kui kromatogrammi hinnatakse ajalise sõltuvuse põhjal ja see ei vasta ülaltoodud kriteeriumitele, tagatakse analüüsi nõutav korratavus sisestandardi kasutamisega (1). Polüdisperssused sõltuvad standardite molekulmassidest. Polüstüreenistandardite kasutamisel on tüüpilised väärtused järgmised:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p on piigi maksimumile vastav standardi molekulmass)

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Polüstüreeni standardlahuste valmistamine**

Polüstüreeni standardid lahustatakse ettevaatlikul segamisel valitud eluendiga. Lahuste valmistamisel peab arvestama tootja soovitusi.

Valitud standardi kontsentratsioonid sõltuvad mitmetest erinevatest teguritest, näiteks süsteruumala, lahuse viskoossus ja analüütilise detektori tundlikkus. Maksimaalset süsteruumala peab kohandama vastavalt kolonni pikkusele, et vältida kolonni ülelaadimist. Geelkromatograafia analüütiliste meetodite korral jäävad tüüpilised süsteruumalad vahemikku 40 kuni 100 µl, kui kolonni mõõdud on 30 cm × 7,8 mm. Võimalik on kasutada ka suuremaid ruumalasid, kuid need ei tohiks ületada 250 µl. Enne kolonni tegelikku kalibreerimist tuleb kindlaks teha süsteruumala ja kontsentratsiooni vaheline optimaalne suhe.

1.6.2. **Proovilahuse valmistamine**

Põhimõtteliselt kehtivad ülaltoodud nõuded ka proovilahuste valmistamisel. Proov lahustatakse sobivas lahustis, näiteks tetrahüdrofuraanis (THF), ettevaatlikul loksutamisel. Mitte mingil juhul ei tohi lahustamiseks kasutada ultrahelivanni. Vajaduse korral puhastatakse proovi lahust membraanfiltriga, mille pooride suurus on 0,2 kuni 2 µm.

Lahustumatute osakeste olemasolu peab ära märkima ka lõplikus aruandes, kuna see võib olla tingitud kõrge molekulmassiga ühenditest. Lahustunud osakeste massiprotsendi määramiseks peab kasutama sobivat meetodit. Valmistatud lahuseid peab kasutama 24 tunni jooksul.

▼B

1.6.3. **Parandused ebapuhtuste ja lisandite sisalduse jaoks**

Tavaliselt on vajalik molekulmassiga M < 1 000 ühendite sisalduse korrigeerimine, mis on tingitud mittepolümeersetest komponentidest (näiteks ebapuhtused ja/või lisandid), välja arvatud juhul, kui nende ühendite mõõdetud sisaldus on niigi < 1 %. Selleks analüüsitakse otse polümeerilahust või geelkromatograafi eluaati.

Kui eluaat on pärast kolonni läbimist liiga lahja edasiseks analüüsiks, siis peab seda kontsentreerima. Vajalik võib olla eluaadi kuivaks aurutamine ja saadud jäägi uuesti lahustamine. Eluaati peab kontsentreerima tingimustel, mis ei põhjusta eluaadis muutusi. Geelkromatograafi eluaadi töötlemine sõltub kvantitatiivseks määramiseks kasutatavast analüütilisest meetodist.

1.6.4. **Seadmed**

Geelkromatograafia seadmed sisaldavad järgmisi komponente:

— mahuti lahustile;

— degaseerija (vajaduse korral);

— pump;

— pulsatsioonisummuti (vajaduse korral);

— injektsioonisüsteem;

— kromatograafilised kolonnid;

— detektor;

— kulumõõtja (vajaduse korral);

— andmesalvesti ja-töötleja;

— nõu jääkide jaoks.

Enne peab kindlaks tegema, et geelkromatograafia süsteem oleks kasutatavate lahustite suhtes inertne (näiteks tetrahüdrofuraani jaoks kasutada teraskapillaare).

1.6.5. **Injektsiooni ja lahusti etteandmise süsteem**

Proovilahuse etteantud kogus sisestatakse automaatse injektoriga või käsitsi täpselt kindlaks määratud kolonni piirkonda. Käsitsi injektsiooni korral võib süstla kolvi liiga kiire tagasitõmbamine või vabastamine põhjustada muutusi mõõdetava molekulmassi jaotuses. Lahusti etteandmise süsteem peaks olema võimalikult pulseerimisvaba, sisaldades ideaaljuhul pulsatsioonisummutit. Voolukiirus on suurusjärgus 1 ml/min.

1.6.6. **Kolonn**

Sõltuvalt proovist kasutatakse polümeeri iseloomustamiseks kas ühte kolonni või mitut järjestikku ühendatud kolonni. Kolonni täitematerjalidena on kaubanduslikult kättesaadavad paljud poorsed kindlate omadustega ained (näiteks poori suurus, eksklusioonipiirid). Lahutamiseks kasutatava geeli või kolonni pikkuse valik sõltub nii proovi omadustest (hüdrodünaamiline ruumala, molekulmasside jaotus) kui ka spetsiifilistest lahutamistingimustest, näiteks lahusti, temperatuur ja voolukiirus (1, 2, 3).

▼B

1.6.7. **Teoreetilised taldrikud**

Lahutamiseks kasutatavat kolonni või kolonnide süsteemi iseloomustatakse teoreetiliste taldrikute arvuga. Tetrahüdrofuraani kasutamisel eluendina hinnatakse seda etüülbenseeni või mõne muu sobiva mittepolaarse lahustunud aine (soluudi) laadimisel teadaoleva pikkusega kolonni. Teoreetiliste taldrikute arv saadakse järgmiste valemite põhjal:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{või} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

kus

N = on teoreetiliste taldrikute arv

V_e = on piigi maksimumile vastav elutsiooniruumala

W = on piigi laius baasjoonel

$W_{1/2}$ = on piigi laius poolel piigi kõrgusel

1.6.8. **Lahutamise efektiivsus**

Lisaks ribalaiust määravale teoreetiliste taldrikute arvule on tähtis ka lahutamise efektiivsus, mis sõltub sellest, kui järsk on kalibreerimiskõvera tõus. Kolonni lahutuse efektiivsus saadakse järgmisest seosest:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{kolonni ristlõikepindala}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kus

$V_{e,\ M_x}$ = on polüstüreeni molekulmassiga M_x elutsiooniruumala

$V_{e,(10.M_x}$ = on kümme korda suurema molekulmassiga polüstüreeni elutsiooniruumala

Süsteemi lahutusvõimet defineeritakse tavaliselt järgmiselt:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kus

$V_{e1,\ } V_{e2}$ = on kahe polüstüreenistandardi elutsiooniruumalad piigi maksimumil

$W_{1,\ } W_2$ = on piigi laiused baasjoonel

$M_{1,\ } M_2$ = on piigi maksimumile vastavad molekulmassid (peaksid erinema kümme korda)

Kolonnisüsteemi R-väärtus peaks olema suurem kui 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Lahustid**

Kõik lahustid peavad olema kõrge puhtusastmega (kasutatava tetrahüdrofuraani puhtus on 99,5 %). Lahustimahuti (vajaduse korral paigutatud inertgaasi atmosfääri) peab olema piisavalt suur, et võimaldada kolonni kalibreerimist ja proovide analüüsi. Enne pumpamist kolonni peab lahustit degaseerima.

1.6.10. **Temperatuurikontroll**

Kriitilise tähtsusega komponentide (injektsioonisilmus, kolonnid, detektor ja torustik) temperatuur peab olema konstantne ja sobima kasutatavale lahustile.

1.6.11. **Detektor**

Detektori eesmärk on kolonnist elueeruva proovi kontsentratsiooni kvantitatiivne mõõtmine. Selleks, et vältida piikide tarbetut laienemist, peab detektori mõõteraku küveti ruumala olema võimalikult väike. See ei tohiks olla suurem kui 10 µl, välja arvatud valguse hajuvust ja viskoossust mõõtvate detektorite korral. Detektorina kasutatakse tavaliselt diferentsiaalrefraktomeetriat. Tingituna proovi või eluendi spetsiifilistest omadustest võib kasutada ka muud tüüpi detektsioonimeetodeid, näiteks UV/VIS, IR, viskoossusdetektorid jms.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

2.1. ANDMED

Hindamiskriteeriumitele ning andmete kogumisele ja töötlemisele esitatavate üksikasjalike nõuete osas peaks järgima DIN standardit (1).

Iga proovi jaoks peab tegema kaks teineteisest sõltumatut katset. Neid katseid peab eraldi analüüsima. Kõikidel juhtudel on oluline arvestada ka pimekatse andmeid, mis on tehtud prooviga samadel katsetingimustel.

Üheselt mõistetavalt peab näitama, et mõõdetud väärtused on suhtelised väärtused, mis on ekvivalentsed kasutatud standardi molekulmassidega.

Pärast retentsiooniruumalade või -aegade kindlaksmääramist (mida võib parandada sisestandardite kasutamisega) esitatakse log M_p väärtused (kus M_p on kalibratsioonistandardi piigi maksimum) ühe järgnevalt toodud suuruse funktsioonina: M_n, M_w või M_w/M_n. Molekulmassi dekaadi (kümnekordse vahemiku) kohta on vaja vähemalt kahte kalibreerimiskõvera punkti ja terve kõvera jaoks on vaja vähemalt viit mõõtepunkti, mis peaks hinnanguliselt katma proovi molekulmassi. Kalibreerimiskõvera madala molekulmassiga osa lõpppunkt määratakse kindlaks n-heksüülbenseeni või muu sobiva mittepolaarse soluudi abil. Kõvera osa, mis vastab molekulmassidele alla 1 000, analüüsitakse ja parandatakse ebapuhtuste ja lisandite suhtes. Elutsioonikõveraid analüüsitakse tavaliselt elektrooniliste andmetöötluse vahenditega. Käsitsi digitaliseerimise kasutamisel võib eeskujuks võtta standardi ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Juhul, kui mis tahes lahustumatu polümeer jääb kolonni, siis on selle molekulmass tõenäoliselt suurem kui mis tahes komponendi oma lahustuvas fraktsioonis ja selle arvesse võtmata jätmisel hinnatakse üle madala molekulmassiga komponentide sisaldust. Madala molekulmassiga komponentide sisalduse määramise parandusjuhised lahustumatu polümeeri jaoks on toodud lisas.

Jaotuskõvera peab esitama tabeli või joonise kujul (diferentsiaalne sagedus või protsentide summa log M funktsioonina). Graafilisel kujutamisel peab üks molekulmassi kümnekordne vahemik olema umbes 4 cm laiune ja piigi maksimum peab olema umbkaudu 8 cm kõrgune. Integraalsete jaotuskõverate korral peab ordinaadi 0 ja 100 % vahemik olema umbes 10 cm laiune.

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. **Katsetatav aine**

— Olemasolev teave analüüsitava aine kohta (identifitseerimiskood, lisandid, ebapuhtused).

— Proovi eeltöötluse täpne kirjeldus, tähelepanekud, probleemid.

2.2.2. **Seadmed**

— Eluendimahuti, inertgaas, eluendi degaseerimine, eluendi koostis, ebapuhtused.

— Pump, pulsatsioonisummuti, injektsioonisüsteem.

— Lahutuskolonnid (tootja, kõik kolonni näitajad, nagu poori suurus, täitematerjali liik jms, kasutatavate kolonnide arv, pikkus ja järjekord).

— Kolonni (või nende kombinatsiooni) teoreetiliste taldrikute arv, lahutamise efektiivsus (süsteemi lahutusvõime).

— Andmed piikide sümmeetria kohta.

— Kolonni temperatuur, temperatuurikontrolli liik.

— Detektor (mõõtmispõhimõte, tüüp, küveti ruumala).

— Kulumõõtja, kui kasutati (tootja, mõõtmispõhimõte).

— Andmete salvestamise ja töötlemise süsteem (riist- ja tarkvara).

2.2.3. **Süsteemi kalibreerimine**

— Kalibreerimiskõvera koostamiseks kasutatud meetodi täpne kirjeldus.

▼B

— Andmed selle meetodi kvaliteedinõuete kohta (näiteks korrelatsioonikoefitsient, ruutsumma viga jms).

— Andmed kõikide ekstrapoleerimiste, oletuste ja lähenduste kohta, mis tehti eksperimendi ning andmete hindamise ja töötlemise käigus.

— Kõik kalibreerimiskõvera koostamiseks tehtud mõõtmised peavad olema dokumenteeritud tabelis, mis sisaldab kalibreerimiskõvera iga punkti kohta alljärgnevat teavet:

  — proovi nimetus;

  — proovi tootja;

  — tootjapoolsed või mõõtmistel saadud standardit iseloomustavad M_p, M_n, M_w ja M_w/M_n väärtused, koos määramismeetodi üksikasjadega;

  — süsteruumala ja -kontsentratsioon;

  — kalibreerimisel kasutatud M_p väärtus;

  — piigi maksimumile vastav mõõdetud elutsiooniruumala või parandatud retentsiooniaeg;

  — piigi maksimumile arvutatud M_p;

  — arvutatud M_p protsentuaalne viga ja kalibreerimistulemus.

2.2.4. **Andmed madalamolekulaarse polümeeri sisalduse kohta**

— Analüüsimeetodite kirjeldus ja katsete tegemise viis.

— Madalamolekulaarsete komponentide protsentuaalne sisaldus (massi järgi) võrreldes kogu prooviga.

— Andmed ebapuhtuste, lisandite ja muude mittepolümeersete komponentide kohta massiprotsendina kogu proovist.

2.2.5. **Hindamine**

— Retentsiooniaja järgi hindamine: nõutava korratavuse tagamiseks kasutatavad meetodid (parandusmeetod, sisestandard jms).

— Teave selle kohta, kas hinnati elutsiooniruumala või retentsiooniaja põhjal.

— Teave hindamise piiratuse kohta, kui piik ei ole täielikult analüüsitud.

— Silumismeetodite kirjeldus, kui neid kasutati.

— Proovi ettevalmistamise ja eeltöötluse protseduurid.

— Lahustumatute osakeste olemasolu.

▼B

— Süsteruumala (µl) ja -kontsentratsioon (mg/ml).

— Tähelepanekud seikade kohta, mis võivad põhjustada kõrvalekaldumist ideaalsest geelkromatograafia profiilist.

— Kõikide katseprotseduurides tehtud muudatuste üksikasjalik kirjeldus.

— Veapiiride üksikasjalikud andmed.

— Mis tahes muu teave ja tähelepanekud, mis puudutavad tulemuste tõlgendamist.

3. **VIITED**

1. DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2. Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3. ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Liide

Madala molekulmassiga komponentide sisalduse parandamise juhised lahustumatu polümeeri olemasolul

Proovis sisalduv lahustumatu polümeer põhjustab massikadu geelkromatograafilises analüüsis. Lahustumatu polümeer jääb pöördumatult kolonni või proovi ettevalmistamisel kasutatud filtrile, kuid proovi lahustuv osa läbib kolonni. Kui polümeeri refraktsiooniindeksi juurdekasvu (dn/dc) saab hinnata või mõõta, siis on võimalik hinnata proovi massikadu kolonnis. Sellisel juhul kasutatakse paranduse tegemiseks välist kalibreerimist teadaoleva kontsentratsiooniga ja dn/dc väärtusega standardainetega, et kalibreerida refraktomeetri signaali. Järgnevas näites kasutatakse polü(metüülmetakrülaat) (pMMA) standardit.

Akrüülpolümeeride analüüsil välise kalibreerimise saamiseks viiakse geelkromatograafi teadaoleva kontsentratsiooniga pMMA standardi lahus tetrahüdrofuraanis ja saadud andmeid kasutatakse refraktomeetri konstandi leidmiseks järgmise valemi põhjal:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kus

K = refraktomeetri konstant (mikrovoltsekund/ml)

R = pMMA standardi signaal (mikrovolt/sekund)

C = pMMA standardi kontsentratsioon (mg/ml)

V = süsteruumala (ml) ja dn/dc pMMA lahuse tetrahüdrofuraanis refraktsiooniindeksi juurdekasv (ml/mg)

Järgmised andmed on tüüpilised pMMA standardi jaoks:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Saadavat K väärtust, 3,05 × 10, kasutatakse teoreetilise detektori signaali arvutamiseks, kui 100 % süstitud polümeerist elueerus läbi detektori.

▼B

A.20. **POLÜMEERIDE LAHUSTUMIS-/EKSTRAHEERUMISKÄITUMINE VEES**

1. **MEETOD**

Kirjeldatav meetod on OECD katsejuhendi nr 120 (1997) parandatud versiooni koopia. Täpsem tehniline lisateave on toodud kirjandusviites (1).

1.1. SISSEJUHATUS

Osade polümeeride, nagu emulsioonipolümeerid, korral on vajalik eeltöötlus enne allkirjeldatud meetodi kasutamist. Meetod ei ole kasutatav vedelate polümeeride ja katsetingimustel veega reageerivate polümeeride jaoks.

Kui meetod ei ole otstarbekohane või võimalik, siis võib polümeeri lahustumis- või ekstraheerumiskäitumist uurida muude meetodite abil. Sellistel juhtudel tuleb kasutatava meetodi kohta esitada kõik üksikasjad ja põhjendused.

1.2. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Polümeeride lahustumis- või ekstraheerumiskäitumist vesilahuses uuritakse muudatustega kolvimeetodil (vt A.6 „Vees lahustuvus”, „Kolvimeetod”), mida on alljärgnevalt kirjeldatud.

1.4. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

1.5. MEETODI KIRJELDUS

1.5.1. **Seadmed**

Meetodi jaoks on vajalikud järgmised seadmed:

— purustamisseade, näiteks jahvatusmasin, kindla suurusega osakeste valmistamiseks;

— seade loksutamiseks, temperatuurikontrolli võimalusega;

— membraanfiltratsiooni süsteem;

— asjakohased analüütilised seadmed;

— standardsed sõelad.

1.5.2. **Proovi ettevalmistus**

Esindusliku proovi peab esmalt vähendama osakeste suuruseni 0,125 kuni 0,25 mm, kasutades vastavaid sõelu. Proovi stabiilsuse tagamiseks või jahvatamiseks võib vajalik olla jahutamine. Kummilaadseid materjale saab purustada vedela lämmastiku temperatuuril (1).

Kui osakeste soovitud suurusega fraktsioon ei ole saavutatav, peab vähendama osakeste suurust nii palju kui võimalik ja saadud tulemused protokollima. Protokollis peab täpselt ära näitama, mil viisil säilitati purustatud proovi enne katset.

▼B

1.5.3. **Protseduur**

Katsetatava aine kolm proovi (igaüks 10 g) kaalutakse vastavalt kolme klaaskorgiga varustatud nõusse ja igaühte lisatakse 1 000 ml vett. Kui polümeeri koguses 10 g ei ole võimalik käsitleda, siis peab kasutama suurimat kogust, mille käsitlemine on veel võimalik, ja muutma vastavalt sellele ka vee kogust.

Nõud suletakse tihedalt ja seejärel loksutatakse temperatuuril 20 °C. Kasutada tuleks konstantsel temperatuuril töötavat loksutit või segajat. 24 tunni pärast tsentrifuugitakse või filtritakse iga nõu sisu ja selges veefaasis määratakse polümeeri kontsentratsioon sobiva analüüsimeetodiga. Kui veefaasi jaoks puudub sobiv analüüsimeetod, siis võib summaarset lahustuvust/ekstraktiivsust hinnata filtril oleva jäägi või tsentrifuugimise sademe kuivkaalu põhjal.

Tavaliselt on vajalik ebapuhtuste ja lisandite ning madala molekulmassiga komponentide kvantitatiivne eristamine. Gravimeetrilise analüüsi korral on tähtis sooritada ka pimekatse ilma testaineta, et hinnata katseprotseduurist tingitud jääkide kogust.

Polümeeride lahustumis- või ekstraheerumiskäitumist vesilahuses temperatuuril 37 °C ning pH 2 ja pH 9 juures võib määrata samal viisil, nagu kirjeldati katse tegemist temperatuuril 20 °C. Vastava pH väärtuse saavutamiseks võib lisada kas sobivaid puhvreid, happeid või aluseid, nagu vesinikkloriidhape, etaanhape, analüütilise puhtusega naatrium- või kaaliumhüdroksiid või ammoniaak.

Sõltuvalt analüüsimeetodist peaks tegema ühe või kaks katset. Kui polümeeri vesilahuse otsese analüüsi jaoks on olemas piisavalt spetsiifilised meetodid, siis piisab ühest eelnevalt kirjeldatud katsest. Kui sellised meetodid ei ole kättesaadavad ja polümeeri lahustumis- või ekstraheerumiskäitumise määramine piirdub vaid kaudse analüüsiga, kus määratakse veefaasi kogu orgaanilise süsiniku sisaldus (TOC), peab tegema lisakatse. Lisakatse hõlmab samuti kolme paralleelkatset, milles kasutatakse kümme korda väiksemat polümeerikogust ja sama veekogust, mida kasutati esimeses katses.

1.5.4. **Analüüs**

1.5.4.1. *Ühe proovi suurusega tehtud katse*

Polümeeri komponentide otseseks analüüsiks veefaasis võib olla sobivaid meetodeid. Alternatiivina saab kasutada lahustunud või ekstraheerunud polümeeri komponentide kaudset analüüsi, millega määratakse lahustuvate komponentide üldine sisaldus ning tehakse parandusi polümeerile mittespetsiifiliste komponentide osas.

Kõikide polümeeri komponentide analüüs veefaasis on võimalik kas piisavalt tundliku meetodiga, näiteks

kogu orgaanilise süsiniku määramine (TOC), kasutades persulfaadi või dikromaadiga lagundamist, tekkiva süsinikdioksiidi koguse määramiseks kasutatakse infrapunaspektroskoopiat või keemilisi analüüsimeetodeid;

— aatomabsorptsioonspektromeetria (AAS) või induktiivsidestunud plasma (ICP) emissioonspektromeetria, kui polümeer sisaldab räni või metalle;

▼B

— UV-absorptsioon või spektrofluoromeetria arüülpolümeeride jaoks;

— vedelikkromatograafia – mass-spektromeetria (LC-MS) madala molekulmassiga proovide jaoks,

— või aurutades vee ekstrakti kuivjäägini ja analüüsides saadud jääki spektroskoopiliselt (IR, UV jms) või AAS/ICP abil.

Kui veefaasi analüüs ei ole teostatav, siis peaks vesiekstrakti ekstraheerima vees segunematu orgaanilise lahustiga, näiteks klorosüsivesinikega. Lahusti aurutatakse ja saadud jäägis analüüsitakse ülalnimetatud polümeeri sisaldust. Selles jäägis sisalduvad ebapuhtusena või lisanditena identifitseeritud komponendid lahutatakse tulemusest, et määrata polümeeri lahustumis- või ekstraheerumisastet.

Kui proov sisaldab suhteliselt palju sellist materjali, siis võib jääki analüüsida vedelikkromatograafia (HPLC) või gaaskromatograafia (GC) abil, et eraldada ebapuhtused monomeeridest ja monomeeridest pärinevatest komponentidest nii, et saab määrata monomeeride tegeliku koguse.

Osadel juhtudel on piisav orgaanilise lahusti aurutamine kuivjäägini ja saadud jäägi kaalumine.

1.5.4.2. *Kahe erineva proovi suurusega tehtud katse*

Kõikides vesiekstraktides analüüsitakse kogu orgaanilist süsinikku (TOC).

Proovi lahustumatut või ekstraheerumatut osa analüüsitakse gravimeetriliselt. Kui pärast iga nõu sisu tsentrifuugimist või filtrimist on nõu seintel polümeeri jääke, siis peab nõud loputama filtraadiga, kuni selle seintel ei ole jääke näha. Seejärel filtritakse või tsentrifuugitakse filtraati uuesti. Filtril või tsentrifuugiklaasis olevat jääki kuivatatakse temperatuuril 40 °C vaakumis ning kaalutakse. Kuivatamist jätkatakse kuni konstantse kaalu saavutamiseni.

2. **ANDMED**

2.1. ÜHE PROOVI SUURUSEGA TEHTUD KATSE

Kõigi kolme kolvikatse tulemused ja keskmised väärtused peab esitama ja tulemused tuleb väljendada massiühikutes lahuse ruumala kohta (tüüpiliselt mg/l) või massiühikutes polümeeri proovi massi kohta (tüüpiliselt mg/g). Lisaks tuleb esitada proovi massikadu (arvutatakse soluudi massi jagamisel esialgse proovi massiga). Katsete puhul tuleks arvutada ka suhteline standardhälve (RSD). Kogu proovi (polümeer + olulised lisandid jms) ja ainult polümeeri (pärast selliste lisandite mõju lahutamist) kohta peab esitama eraldi tulemused.

▼B

2.2. KAHE ERINEVA PROOVI SUURUSEGA TEHTUD KATSE

Kahest kolme paralleelkatsega eksperimendist saadud TOC väärtused ja iga eksperimendi keskmine tuleb esitada massiühikuna lahuse ruumala kohta (tavaliselt mgC/l) ja massiühikuna proovi massi kohta (tavaliselt mgC/g).

Kõrge ja madala proovi/vee suhtega katsetulemuste vahelise erinevuse puudumine viitab sellele, et kõik ekstraheeruvad komponendid on ekstraheerunud. Sellistel juhtudel ei ole tavaliselt otsene analüüs vajalik.

Jääkide massid peab esitama ja tulemused tuleb väljendada protsendina proovi esialgsest massist. Iga katse jaoks peab arvutama keskmise. Erinevused 100 % ja leitud protsendi vahel esitavad lahustuva ja ekstraheeruva materjali protsendilist sisaldust esialgses proovis.

3. **ARUANDLUS**

3.1. ARUANNE

Katsetulemused peavad sisaldama järgmist teavet.

3.1.1. **Katsetatav aine**

— Olemasolev teave analüüsitava ühendi kohta (identifitseerimiskood, lisandid, ebapuhtused, madala molekulmassiga komponentide sisaldus).

3.1.2. **Katse tingimused**

— Kasutatud protseduuride kirjeldus ja katse tingimused.

— Analüütiliste ja määramismeetodite kirjeldus.

3.1.3. **Tulemused**

— Lahustuvuse/ekstraktiivsuse tulemused (mg/l); erinevates lahustes tehtud ekstraktsioonikatsete üksikud ja keskmised väärtused, lagunenud polümeeri sisaldus, ebapuhtused, lisandid jms.

— Polümeeri lahustuvuse/ekstraktiivsuse tulemused (mg/g).

— Kui mõõdeti, siis vee ekstraktide TOC tulemused, soluudi mass ja arvutatud protsendid.

— Iga proovi pH väärtus.

— Pimekatsete tulemused.

— Kus vajalik, peab viitama katsetatava ühendi keemilisele ebastabiilsusele nii katse kui ka analüütilise protsessi käigus.

— Kogu teave, mis on oluline tulemuste tõlgendamisel.

4. **VIITED**

1. DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. OKSÜDEERIMISVÕIME (VEDELIKUD)

1. MEETOD

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et mõõta vedeliku võimet suurendada põleva materjali põlemiskiirust või põlemisintensiivsust või moodustada segu tuleohtliku ainega, mis süttib iseeneslikult juhul, kui need kaks ainet segatakse omavahel põhjalikult. See põhineb oksüdeerivate vedelike (1) ÜRO katsel ja on sellega samaväärne. Kuna käesolev meetod A.21 on algselt ette nähtud vastama määruse (EÜ) nr 1907/2006 nõuetele, on vaja teha võrdlus üksnes ühe võrdlusainega. Katsete tegemine ja võrdlemine täiendava võrdlusainega võib olla vajalik juhul, kui eeldatakse, et katse tulemusi kasutatakse muudel eesmärkidel ([1]).

Käesolevat katset ei ole vaja teha juhul, kui struktuurivalemi uurimine teeb kahtlusteta kindlaks, et aine ei reageeri tuleohtliku materjaliga eksotermiliselt.

On kasulik teada enne katsetamist, kas aine võib plahvatada.

Käesolev katse ei ole kasutatav tahkete ainete, gaaside, plahvatusohtlike või kergestisüttivate ainete ega orgaaniliste peroksiidide puhul.

Käesolevat katset ei ole vaja teha juhul, kui oksüdeerivaid vedelikke (1) käsitlevas ÜRO katses on tulemused uuritava katseaine kohta juba olemas.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Keskmine rõhutõusuaeg on katse käigus manomeeterrõhu suurenemiseks 690 kPa-lt 2 070 kPa-le kulunud aegade keskmine.

1.3. VÕRDLUSAINE

Võrdlusainena kasutatakse 65 %list (massiprotsent) lämmastikhappe vesilahust (analüütiliselt puhas) ([2]).

([1]) Näiteks ÜRO transpordieeskirjade raames.
([2]) Hapet tuleks kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks enne katse tegemist tiitrida.

▼B

Kui katse tegija näeb ette, et katse tulemusi võib lõpuks kasutada muudel eesmärkidel, ([1]) võib soovi korral samuti osutuda vajalikuks katse tegemine täiendavate võrdlusainetega ([2]).

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav vedelik segatakse kiudtselluloosiga massisuhtes 1:1 ja pannakse surveanumasse. Kui segamisel või anuma täitmisel ilmneb isesüttimine, ei ole vaja katsete tegemist jätkata.

Kui isesüttimist ei toimu, tehakse kogu katse. Segu kuumutatakse surveanumas ja määratakse kindlaks keskmine aeg, mis kulub manomeeterrõhu suurenemiseks 690 kPa-lt 2 070 kPa-le. Seda võrreldakse sellise keskmise ajaga, mis kulub võrdlusaine(te) ja tselluloosi 1:1 segu korral rõhu suurenemiseks.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Ühe ainega tehtud viiest katsest koosnevas seerias ei tohi ükski tulemus erineda aritmeetilisest keskmisest rohkem kui 30 %. Tulemused, mis erinevad keskmisest rohkem kui 30 %, jäetakse kõrvale, täiustatakse segamis- ja täitmismenetlust ning korratakse katset.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Ettevalmistus**

1.6.1.1. *Põlev aine*

Põleva ainena kasutatakse kuivatatud kiudtselluloosi, mille kiu pikkus on 50–250 μm ja keskmine läbimõõt on 25 μm ([3]). Seda kuivatakse konstantse kaaluni kuni 25 mm paksuses kihis 105 °C juures neli tundi ja hoitakse eksikaatoris koos desikandiga kuni jahtumise ja kasutamiseni. Kuivatatud tselluloosi niiskusesisaldus peaks olema alla 0,5 % kuivmassist ([4]). Vajaduse korral peaks selle tagamiseks kuivatamisaega pikendama ([5]). Tselluloosi sama partiid kasutatakse kogu uuringu vältel.

([1]) Näiteks ÜRO transpordieeskirjade raames.
([2]) Nt 50 % (massiprotsent) perkloorhapet ja 40 % (massiprotsent) naatriumkloraati kasutatakse viites 1.
([3]) Nt Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, kataloginumber 4021 050.
([4]) Kinnitatakse nt tiitrimisega Karl-Fisheri järgi.
([5]) Nimetatud niiskusesisaldust on võimalik saavutada ka nt kuumutamisel 105 °C juures vaakumis 24 tunni jooksul.

▼B

1.6.1.2. *Seadmed*

1.6.1.2.1. S u r v e a n u m

Vaja läheb surveanumat. Anumaks on silindriline terasest anum, mille pikkus on 89 mm ja välisläbimõõt on 60 mm (vt joonist 1). Vastaskülgedel paikneb kaks tasapinnalist süvendit (millega on anuma sisemist vaba ruumi vähendatud 50 mm-ni) süüteküünla ja väljalaskeava korgi paigaldamise hõlbustamiseks. Anumas oleva 20 mm siseläbimõõduga kanali mõlemas otsas on 19 mm astmetaoline laiend, mis on keermestatud vastavalt Briti standardsele 1" torukeermele *(British Standard Pipe* – BSP) või samaväärsele meeterkeermele. Surveanuma kumerasse külgpinda on ühest otsast 35 mm kaugusele kruvitud külgharu, mis paikneb tasapinnaliste süvenditega 90° nurga all ning mis on ette nähtud ühendamiseks rõhuanduriga. Külgharu pesa moodustab 12 mm sügavune puuritud ava, mis on keermestatud vastavalt külgharu otsas oleva 1/2" BSP keermega (või samaväärse meeterkeermega). Vajaduse korral paigaldatakse inertne tihend, mis tagab hermeetilise ühenduskoha. Külgharu ulatub 55 mm surveanuma korpusest väljapoole ja sellesse on puuritud kanal siseläbimõõduga 6 mm. Külgharu otsas on astmetaoline keermestatud süvend, mis on ette nähtud ühendamiseks membraani tüüpi rõhuanduriga. Kasutada võib mis tahes rõhumõõturit, tingimusel et seda ei mõjuta kuumad gaasid või lagunemissaadused ning et see on võimeline reageerima rõhutõusudele 690 – 2 070 kPa vähem kui 5 ms jooksul.

Surveanuma külgharust kaugemal asuv ots on suletud süüteküünlaga, milles on kaks elektroodi –üks on isoleeritud küünla korpusest ja teine on sellega ühendatud (maandatud). Surveanuma teine ots on suletud puruneva membraaniga (purunemissurve ligikaudu 2 200 kPa), mida hoiab paigal 20 mm läbimõõduga puuritud avaga kork. Vajaduse korral kasutatakse ühenduskoha hermeetilisuse tagamiseks inertset tihendit. Tugiraam (joonis 2) hoiab komplekti kasutamise ajal õiges asendis. Tugiraam koosneb tavaliselt pehmest rauast alusplaadist, mille mõõtmed on 235 mm × 184 mm × 6 mm, ja 185 mm pikkusest õõnsusega ruudukujulisest sektsioonist (S.H.S.) mõõtmetega 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Õõnsusega ruudukujulise sektsiooni ühe otsa kaks vastaskülge on maha lõigatud selliselt, et moodustub kahest tasapinnalise küljega jalast struktuur, mille otsas paikneb 86 mm pikkune terviklik karbikujuline osa. Nende tasapinnaliste külgedega jalgade otsad on lõigatud horisontaalsuuna suhtes 60° all ning on keevitatud alusplaadi külge. Põhisektsiooni ülaosa ühes küljes paikneb pilu laiusega 22 mm ja sügavusega 46 mm nii, et kui rõhuanuma komplekt lastakse allapoole, süüteküünlaga ots ees, siis satub külgharu pilusse. Karbikujulise osa alumise sisepinna külge keevitatakse terasest 30 mm laiune ja 6 mm paksune detail, mis toimib eraldajana. Kaks vastasküljel olevat 7 mm pitskruvi hoiavad surveanumat kindlalt paigal. Kaks 12 mm laiust ja 6 mm paksust terasriba, mis on keevitatud karbikujulise sektsiooni põhjale toetuvate külgmiste elementide külge, toetavad surveanumat altpoolt.

▼B

1.6.1.2.2. S ü ü t e s ü s t e e m

Süütesüsteem koosneb 25 cm pikkusest Ni/Cr traadist, mille läbimõõt on 0,6 mm ja takistus on 3,85 oom/m. Traat on keritud spiraalina 5 mm läbimõõduga varda abil ja kinnitatud süüteküünla elektroodide külge. Spiraali kuju peaks vastama joonisel 3 toodule. Anuma põhja ja süütespiraali alakülje vaheline kaugus peaks olema 20 mm. Kui elektroode ei saa reguleerida, tuleks süütespiraali ja anuma põhja vahel olevad traadi otsad isoleerida keraamilise kestaga. Traati kuumutatakse püsivoolutoiteallikaga, mis suudab tagada vähemalt 10 A voolutugevuse.

1.6.2. **Katse tegemine** ([1])

Seade, mis on komplekteeritud rõhuanduri ja kuumutussüsteemiga, kuid kuhu ei ole paigaldatud purunevat membraani, toetub altpoolt süüteküünlale. 2,5 g uuritavat vedelikku segatakse keeduklaasis 2,5 g kuivatatud tselluloosiga, kasutades klaasist segamispulka ([2]). Ohutuse tagamiseks on tegija ja segu vahel segamise ajal kaitseekraan. Kui segu süttib segamise või anuma täitmise ajal, ei ole vaja katsetamist jätkata. Segu lisatakse tilkhaaval väikeste portsjonitena surveanumasse, tagades segu paiknemise ümber süütespiraali ja sellega hea kontakti. On oluline, et spiraal ei deformeeru anuma täitmise ajal, kuna see võib põhjustada väärasid tulemusi ([3]). Purunev membraan asetatakse kohale ja lukustav kork keeratakse kõvasti kinni. Täidetud anum asetatakse tugiraamile nii, et purunev membraan jääb ülespoole. Tugiraam asetatakse sobivasse armeeritud tõmbekappi või põlemiskambrisse. Toiteallikas ühendatakse süüteküünla välimiste klemmidega ja lülitatakse sisse 10 A vool. Aeg segamise alustamisest kuni voolu sisselülitamiseni ei tohiks ületada kümmet minutit.

Rõhuanduri signaal registreeritakse sobiva süsteemi abil, mis võimaldab nii signaali hindamist kui ka rõhu ajalise sõltuvuse pidevat registreerimist (nt graafilise isekirjutiga ühendatud siirdeprotsesside registraator). Segu kuumutatakse kuni puruneva membraani rebestumiseni või vähemalt 60 s. Kui purunev membraan ei rebestu, tuleks lasta segul jahtuda enne seadme hoolikat lahtimonteerimist, vältides seejuures võimalikku hermeetilisuse kadumist. Uuritava aine ja võrdlusaine(te)ga tehakse viis katset. Fikseeritakse aeg, mis kulub manomeeterrõhu tõusuks 690 kPa-lt 2 070 kPa-le. Arvutatakse keskmine rõhutõusuaeg.

Mõnedel juhtudel võivad ained tekitada rõhutõusu (liiga suurt või liiga väikest), mille põhjuseks on keemilised reaktsioonid, mis ei ole seotud aine oksüdeerimisvõimega. Neil juhtudel võib osutuda vajalikuks katse kordamine tselluloosi asemel inertse ainega, nt diatomiidiga (kobediatomiit), et selgitada reaktsiooni olemust.

([1]) Oksüdeerijate ja tselluloosi segusid tuleb käsitada plahvatusohtlikena ja käsitleda ettevaatlikult.

([2]) Praktikas saab seda teha, valmistades 1:1 segu uuritavast vedelikust ja tselluloosist suuremas koguses, kui katseks vaja, ning pannes 5 ± 0,1 g surveanumasse. Igaks katseks tuleb segu värskelt valmistada.

([3]) Eelkõige tuleb vältida spiraali naaberkeerdude vahelist kontakti.

▼B

2. **ANDMED**

Rõhutõusuajad nii uuritava aine kui ka võrdlusaine(te) puhul. Rõhutõusuajad inertse ainega katsete puhul (kui need on tehtud).

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Arvutatakse keskmised rõhutõusuajad nii uuritava aine kui ka võrdlusaine(te) kohta.

Arvutatakse keskmine rõhutõusuaeg inertse ainega katsete puhul (kui need on tehtud).

Mõned näited tulemuste kohta on toodud tabelis 1.

Tabel 1

Näiteid tulemustest [a]

Aine [b]	Keskmine rõhutõusu aeg (ms) 1:1 tselluloosisegu puhul
Ammooniumdikromaat, küllastunud vesilahus	20 800
Kaltsiumnitraat, küllastunud vesilahus	6 700
Raud(III)nitraat, küllastunud vesilahus	4 133
Liitiumperkloraat, küllastunud vesilahus	1 686
Magneesiumperkloraat, küllastunud vesilahus	777
Nikkelnitraat, küllastunud vesilahus	6 250
Lämmastikhape, 65 %	4 767 [c]
Perkloorhape, 50 %	121 [c]
Perkloorhape, 55 %	59
Kaaliumnitraat, 30 % vesilahus	26 690
Hõbenitraat, küllastunud vesilahus	— [d]
Naatriumkloraat, 40 % vesilahus	2 555 [c]
Naatriumkloraat, 45 % vesilahus	4 133
Inertne aine	
Vesi: tselluloos	— [d]

[a] Vt viidet 1 ÜRO transpordieeskirjade kohase klassifitseerimise kohta.
[b] Küllastunud lahused tuleks valmistada 20 °C juures.
[c] Laboritevaheliste võrdluskatsete keskmine väärtus.
[d] Suurimat rõhku 2 070 kPa ei ole saavutatud.

▼B

3. **ARUANDLUS**

3.1. ARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet:

— uuritud aine nimetus, koostis, puhtus jne;

— uuritava aine kontsentratsioon;

— tselluloosi kuivatusmenetlus;

— tselluloosi niiskusesisaldus;

— mõõtetulemused;

— inertse ainega tehtud katsete tulemused, kui need on olemas;

— arvutatud keskmised rõhutõusuajad;

— võimalikud kõrvalekalded nimetatud meetodist ja nende põhjused;

— kogu täiendav teave või märkused, mis on vajalikud tulemuste tõlgendamiseks.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE ([1])

Katsetulemusi hinnatakse

a) selle põhjal, kas uuritava aine ja tselluloosi segu süttib ise, ja

b) rõhutõusule (690 kPa-lt 2 070 kPa-le) kulunud keskmise aja võrdlemisel võrdlusaine(te) korral selleks kulunud ajaga.

Vedelikku käsitatakse oksüdeerijana juhul, kui

a) uuritava aine ja tselluloosi 1:1 segu (massi järgi) süttib iseeneslikult või

b) uuritava aine ja tselluloosi 1:1 segu (massi järgi) korral on keskmine rõhutõusuaeg väiksem 65 massiprotsendilise lämmastikhappe (vesilahus) ja tselluloosi 1:1 segu (massi järgi) korral saadud keskmisest rõhutõusuajast või on sellega võrdne.

Valepositiivse tulemuse vältimiseks tuleks tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta ka tulemusi, mis on saadud aine katsetamisel koos inertse materjaliga.

([1]) Vt viide 1, tulemuste tõlgendamine ÜRO transpordieeskirjade kohaselt mitmeid võrdlusaineid kasutades.

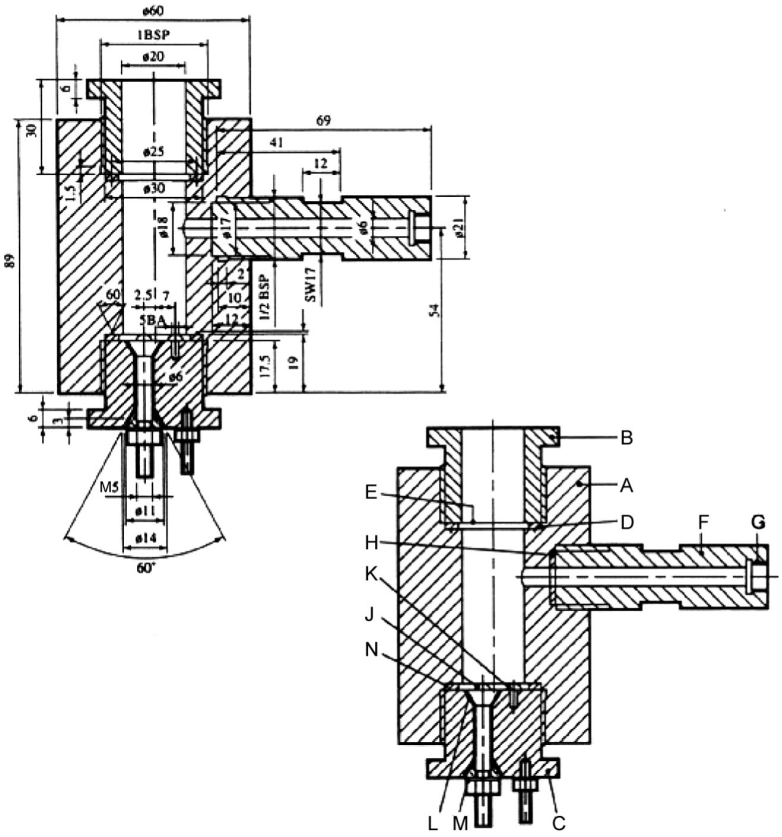
▼B

4. **VIITED**

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3. täiendatud väljaanne. ÜRO väljaanne nr: ST/SG/AC.10/ll/Rev. 3, 1999, lk 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Joonis 1

Surveanum

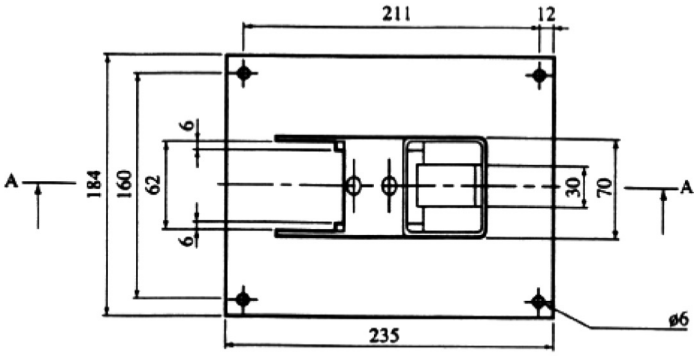


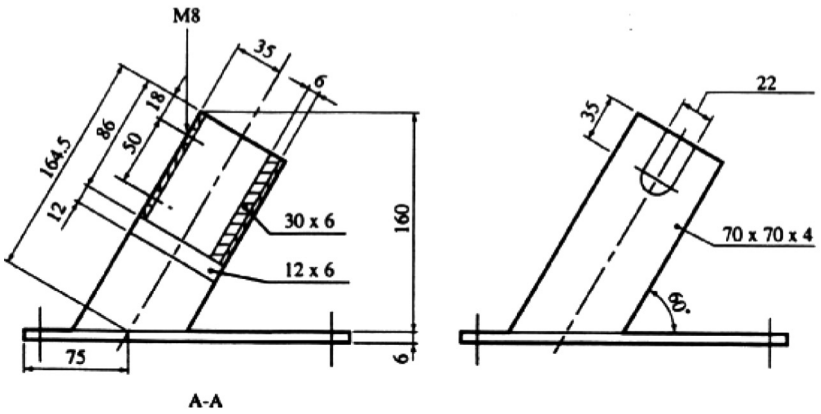
(A) Surveanuma korpus	(B) Purunevat membraani paigalhoidev kork	(C) Süüteküünal
(D) Pehme tinatihend	(E) Purunev membraan	(F) Külgharu
(G) Rõhuanduri pea	(H) Tihend	(J) Isoleeritud elektrood
(K) Maandatud elektrood	(L) Isolatsioon	(M) Teraskoonus
(N) Tihendit deformeeriv soon		

▼B

Joonis 2

Tugiraam

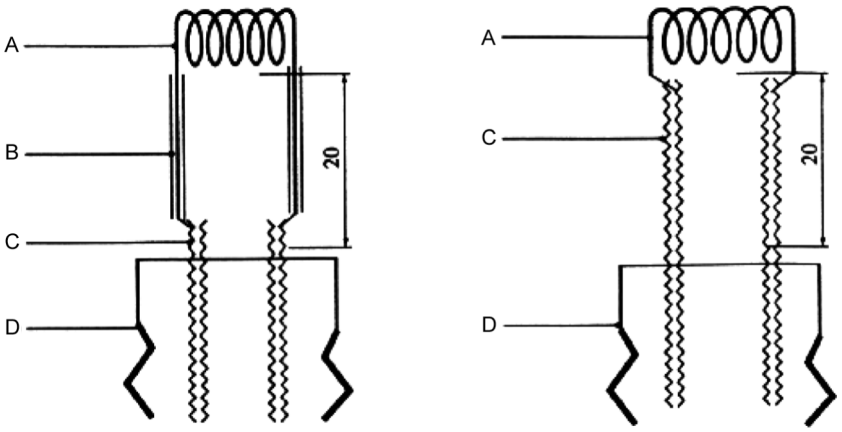




Joonis 3

Süütesüsteem

(A) Süütespiraal (B) Isolatsioon (C) Elektroodid (D) Süüteküünal



Märkus: toodud kujutistest võib kasutada emba-kumba.

▼M1

A.22. **KIUDUDE PIKKUSE JÄRGI KAALUTUD GEOMEETRILINE KESKMINE DIAMEETER**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

See meetod kirjeldab protseduuri lahtiste keemiliste mineraalkiudude (MMMF, *Man Made Mineral Fibres*) pikkuse järgi kaalutud geomeetrilise keskmise diameetri (LWGMD, *Length Weighted Geometric Mean Diameter*) mõõtmiseks. Kuna kogumi LWGMD on 95 % tõenäosusega proovi 95 % usalduspiiride vahel (LWGMD ± kaks standardviga), asub esitatud väärtus (testväärtus) proovi madalamal 95 % usalduspiiril (st LWGMD – kaks standardviga). Meetod põhineb 1994. aasta juunis uuendatud HSE tööstusprotseduuri kavandil, mis kooskõlastati ECFIA ja HSE kohtumisel Chesteris 26. septembril 1993 ja mida arendati edasi teise laboritevahelise katse jaoks ja selle põhjal (1, 2). Seda mõõtmismeetodit saab kasutada selliste lahtiste ainete või toodete kiudiameetri iseloomustamiseks, mis sisaldavad MMMFisid, kaasa arvatud tulekindlad keraamilised kiud (RCF, *refractory ceramic fibres*), keemilised klaaskiud (MMVF, *man-made vitreous fibres*), kristallilised ja polükristallilised kiud.

Pikkuse järgi kaalumine on viis kompenseerida diameetri jaotumist, mida põhjustab pikkade kiudude murdumine materjalist proovi võtmisel või materjali käsitsemisel. Geomeetrilist statistikat (geomeetrilist keskmist) kasutatakse MMMFide diameetri suuruse järgi jaotumise mõõtmiseks, kuna nende diameetrite jaotus suuruse järgi on tavaliselt lähedane logaritmilisele normaaljaotusele.

Nii pikkuse kui diameetri mõõtmine on tüütu ja aeganõudev, aga kui mõõdetakse vaid neid kiudusid, mis puudutavad lõpmatult peenikest riba skaneeriva elektronmikroskoobi (SEM) vaateväljas, siis on antud kiu valimise tõenäosus võrdeline selle pikkusega. Kuna sellega võetakse arvesse pikkust pikkuse järgi kaalumise arvutustes, on ainus nõutav mõõtmine diameetri mõõtmine ja „LWGMD – kaks standardviga” võib arvutada kirjeldatud viisil.

1.2. MÕISTED

Partikkel – objekt, mille pikkuse-laiuse suhe on vähem kui 3:1.

Kiud – objekt, mille pikkuse-laiuse suhe (formaadisuhe) on vähemalt 3:1.

1.3. RAKENDUSALA JA PIIRANGUD

Meetod on mõeldud vaatlemaks diameetri jaotumisi, keskmise diameetriga alates 0,5 μm kuni 6 μm. Suuremaid diameetreid võib mõõta, kasutades väiksemaid SEMi suurendusi, kuid meetodi täpsus väheneb peenemate kiudude jaotuste puhul ja kui keskmine diameeter on alla 0,5 μm, soovitatakse mõõtmist TEMiga (transmissiooni elektronmikroskoop).

▼M1

1.4. Katsemeetodi põhimõte

Kiu kihist või lahtisest kiumassist võetakse mitu representatiivset südamikuproovi. Lahtiste kiudude pikkust vähendatakse purustava protseduuri abil ja representatiivne osaproov hajutatakse vees. Eraldatakse alikvoodid ja filtreeritakse need läbi 0,2 μm poorisuurusega polükarbonaadifiltri ja valmistatakse ette uurimiseks SEMi tehnikate abil. Kiu diameeter mõõdetakse 10 000-kordse või suurema ekraanisuurendusega, ([1]) kasutades erapooletu keskmise diameetri hinnangu andmiseks liini katkestamise meetodit. Arvutatakse madalam 95 % usaldusvahemik (mis põhineb ühepoolsel testil), et anda hinnang materjali kiudiameetri geomeetrilise keskmise väikseima väärtuse kohta.

1.5. Katsemeetodi kirjeldus

1.5.1. **Turvalisus/ettevaatusabinõud**

Isiklikku kokkupuudet õhus sisalduvate kiududega tuleks minimeerida ja kuivkiudude käsitsemisel tuleks kasutada tõmbekappi või laminaarboksi. Kontrollmeetodite tõhususe kindlaksmääramiseks tuleks läbi viia korrapärast isikliku kokkupuute seiret. MMMFide käsitsemisel tuleb nahaärrituse vähendamiseks ja ristsaastumise ärahoidmiseks kanda ühekordselt kasutatavaid kindaid.

1.5.2. **Seadmed/vahendid**

— Press ja pressvormid (võimelised tekitama 10 MPa).

— 0,2 μm poorisuurusega polükarbonaat-kapillaarfiltrid (25 mm diameetriga).

— 5 μm poorisuurusega tselluloos-ester membraanifilter tugifiltrina kasutamiseks.

— Klaasist filtreermisseadmed (või ühekordselt kasutatavad filtreerimissüsteemid) 25 mm diameetriga filtritele (nt Millipore'i klaasist mikroanalüüsikomplekt, tüüp nr XX10 025 00).

— Värskelt destilleeritud vesi, mis on mikroorganismide eemaldamiseks lastud läbi 0,2 μm poorisuurusega filtri.

— Pihusti kuld- või kuld/pallaadiumotsaga.

— Skaneeriv elektronmikroskoop lahutamisvõimega kuni 10 nm ja 10 000-kordse suurendusega.

— Muu: spaatlid, tüüp 24, skalpellitera, pintsetid, SEMi torud, süsinikliim või süsinikteip, kolloidhõbe.

— Ultrahelisond või lauale asetatav ultrahelivann.

— Südamiku proovivõtuvahend või korgipuur südamikuproovide võtmiseks MMMFide kihist.

([1]) See suurendusväärtus kehtib 3 μm kiu puhul, 6 μm kiu puhul võib 5 000-kordne suurendus olla sobivam.

▼**M1**

1.5.3. **Katsemenetlus**

1.5.3.1. *Proovivõtmine*

Mineraalvilla ja villaku puhul kasutatakse ristlõikest proovide võtmisel 25 mm südamikuproovide võtmise vahendit või korgipuuri. Proovid peaksid olema võrdselt jaotatud kihi laiuse ulatuses või võetud suvalistest kohtadest, kui käepärast on pikki kihte. Samade vahendite abil on võimalik eraldada juhuslikke proove lahtisest kiust. Võimaluse korral tuleks ruumiliste variatsioonide peegeldamiseks lahtises materjalis võtta kuus proovi.

Kuus südamikuproovi purustatakse 50 mm läbimõõduga vormis 10 MPa juures. Materjal segatakse spaatliga ja pressitakse uuesti 10 MPa juures. Seejärel võetakse materjal vormist välja ja säilitatakse seda suletud klaaspudelis.

1.5.3.2. *Proovi ettevalmistamine*

Orgaanilist sideainet saab vajaduse korral eemaldada, asetades kiu umbes tunniks 450 °C sulatusahju.

Proovi jaotamiseks vormitakse see koonuseks ja lõigatakse see neljaks (seda tuleks teha tolmukapis).

Spaatli abil lisatakse väike hulk (< 0,5 g) proovist 100 ml värskelt destilleeritud veele, mis on lastud läbi 0,2 μm membraaniga filtri (alternatiivina võib kasutada ultrapuhast vett muudest allikatest, kui need vastavad nõuetele). Proov hajutatakse põhjalikult ultrahelisondi abil 100 W võimsuse juures ja seda pööratakse nii, et tekiks kavitatsioon. (Kui sondi pole käepärast, kasutada järgmist meetodit: proovi raputatakse ja pööratakse korduvalt ümber 30 sekundi jooksul; hoitakse viis minutit lauale asetatavas ultrahelivannis; seejärel raputatakse ja pööratakse korduvalt veel 30 sekundi jooksul).

Kohe pärast kiu hajutamist eemaldatakse teatud arv alikvoote (näit kolm 3, 6 ja 10 ml alikvooti), kasutades laiasuulist pipetti (2–5 ml mahutavusega).

Iga alikvoot vaakumfiltreeritakse läbi 0,2 μm polükarbonaatfiltri, mida toetab 5 μm poorisuurusega MEC-tugifilter, kasutades 25 mm klaasist filterlehtrit silindrilise mahutiga. Umbkaudu 5 ml filtreeritud destilleeritud veest tuleks asetada lehtrisse ja alikvoot aeglaselt vette pipettida, hoides pipetiotsa allpool meniskit. Peale pipettimist tuleb pipett ja veemahuti põhjalikult läbi loputada, kuna peenikesed kiud kipuvad jääma pinnale.

Filter eemaldatakse hoolikalt ja eraldatakse see tugifiltrist enne mahutisse kuivama asetamist.

▼M1

Filtreeritud osast lõigatakse veerand või pool tüüp 24 skalpelliga edasi-tagasi liigutuste abil. Lõigatud osa kinnitatakse ettevaatlikult SEMi esemelaua külge süsinikteibi või süsinikliimi abil. Kolloidhõbedat tuleks lisada vähemalt kolme kohta, et parandada elektrilist kontakti filtri ja esemelaua äärtel. Kui liim/kolloidhõbe on kuiv, pihustada proovi pinnale umbes 50 nm kulla või kulla/pallaadiumi kiht.

1.5.3.3. *SEMi kalibreerimine ja kasutamine*

1.5.3.3.1. K a l i b r e e r i m i n e

SEMi kalibreerimist tuleks kontrollida vähemalt kord nädalas (ideaaljuhul kord päevas), kasutades sertifitseeritud kalibreerimisvõret. Kalibreerimist tuleks kontrollida sertifitseeritud standardi alusel ja kui mõõdetud väärtus (SEM) ei jää ± 2 % sisse sertifitseeritud väärtusest, siis tuleb SEM-kalibreerimist kohandada ja uuesti kontrollida.

SEM peaks olema võimeline lahendama vähemalt minimaalselt nähtava diameetri 0,2 μm, kasutades tegelikku proovimaatriksit, 2 000-kordse suurendusega.

1.5.3.3.2. K a s u t a m i n e

SEM peaks töötama 10 000-kordse suurenduse ([1]) juures tingimustel, mis annavad hea lahutusvõime lubatava kujutise aeglasel skaneerimiskiirusel, näiteks 5 sekundit kaadri kohta. Kuigi erinevate SEMide kasutamisnõuded võivad varieeruda, tuleks suhteliselt väikese aatommassiga materjalide korral üldiselt parima nähtavuse ja resolutsiooni saavutamiseks kasutada kiirendavat pinget 5–10 keV, väikest laotuspunkti seadistust ja lühikest töökaugust. Lineaarse skaneerimise puhul tuleb kasutada 0^{o} kallet, et minimeerida refokuseerimine, või kui SEMil on võimalik kohaldada kõrgust, tuleks kasutada kohaldatud kõrgusega töökaugust. Võib kasutada väiksemat suurendust, kui materjal ei sisalda väikseid (väikese diameetriga) kiude ja kiudude diameeter on suur (> 5 μm).

1.5.3.4. *Suuruse järgi sorteerimine*

1.5.3.4.1. V ä i k e s e s u u r e n d u s e g a u u r i m i n e p r o o v i h i n d a m i s e k s

Algselt tuleks proovi uurida väikese suurendusega, et otsida tõendust suurte kiudude pundarde kohta ning hinnata kiutihedust. Juhul kui moodustub liiga palju puntraid, on soovitatav ette valmistada uus proov.

Statistilise täpsuse jaoks on vaja mõõta miinimumarv kiude ja suur kiutihedus võib tunduda soovitav, kuna tühjade väljade uurimine on aeganõudev ega oma analüüsi jaoks väärtust. Kui aga filter on üle koormatud, muutub kõigi mõõdetavate kiudude mõõtmine siiski raskeks, ja kuna väikesed kiud võivad jääda suuremate varju, võivad need jääda kahe silma vahele.

([1]) 3 μm kiudude korral vt eelmist märkust.

▼**M1**

Kalduvus LWGMD ülehindamisele võib tuleneda kiutihedustest enam kui 150 kiudu millimeetri kohta lineaarse sammu puhul. Teisest küljest pikendab väike kiukontsentratsioon analüüsi aega ja sageli on mõistlikum valmistada ette proov, mille kiutihendus on lähedasem optimaalsele, kui jätkata madala kontsentratsiooniga filtrite loendamist. Optimaalne kiutihedus peaks andma keskmiselt üks või kaks loendatavat kiudu vaatevälja kohta 5 000-kordse suurendusega. Siiski sõltub optimaalne tihedus kiudude suurusest (diameetrist), nii et on vajalik, et operaator kasutaks teatavat eksperdihinnangut otsustamaks, kas kiu tihedus on optimaalse lähedane või mitte.

1.5.3.4.2. K i u d i a m e e t r i k a a l u m i n e p i k k u s e j ä r g i

Loendatakse vaid kiude, mis puudutavad (lõpmatult) peenikest SEMi ekraanile tõmmatud joont (või lõikuvad sellega). Selleks on ekraani keskele tõmmatud horisontaalne (või vertikaalne) joon.

Alternatiivina võib ekraani keskele asetada üksiku punkti ja alustada pidevat skaneeringut ühes suunas üle filtri. Mõõdetakse ja salvestatakse iga sellise kiu diameeter, mille formaadisuhe on suurem kui 3:1 ja mis puudutab või ületab seda punkti.

1.5.3.4.3. K i u d u d e s o r t e e r i m i n e s u u r u s e j ä r g i

Soovitav on mõõta minimaalselt 300 kiudu. Iga kiudu mõõdetakse ainult korra ja selles punktis, kus ta lõikub kujutisele paigutatud joone või punktiga (või lõikumiskoha lähedal, kui kiu servad on hägused). Kui leidub ebaühtlase põiklõikega kiude, tuleks kasutada mõõtmist, mis vastab kiu keskmisele diameetrile. Hoolikas tuleb olla kiuservade määratlemisel ja nendevahelise lühima kauguse mõõtmisel. Sorteerimist võib läbi viia *on-line* või *off-line* salvestatud kujutistel või fotodel. Soovitatav on kasutada poolautomatiseeritud kujutise mõõtmise süsteeme, mis laadivad andmed otse arvutustabelisse, kuna need säästavad aega ja välistavad ümberkirjutusvead ning arvutusi on võimalik automatiseerida.

Pikkade kiudude otsi tuleks kontrollida väikese suurendusega, et välistada nende tagasikeerdumine mõõtmise vaatevälja ja tagada, et neid mõõdetakse ainult üks kord.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Kiudiameetritel ei esine tavaliselt normaaljaotust. Siiski on logaritmteisenduse abil võimalik saavutada normaaljaotusele lähenev jaotus.

Arvutatakse n kiudiameetri (D) naturaallogaritmide (lnD) aritmeetiline keskmine (keskmine lnD) ja standardhälve (SD_{lnD}).

$$\text{keskmine } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{keskmine } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardhälve jagatakse mõõtmiste arvu (n) ruutjuurega, et saada standardviga (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Keskmisest lahutatakse kahekordne standardviga ja arvutatakse selle väärtuse eksponent (keskmine miinus kaks standardviga), et saada geomeetriline keskmine miinus kaks geomeetrilist standardviga.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{keskmine } lnD - 2SElnd)} \quad (4)$$

3. **ARUANDMINE**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks sisaldama vähemalt järgmist teavet:

— avaldise LWGMD – 2SE väärtus;

— mis tahes hälbed ja eriti need, mis võivad avaldada mõju tulemuste täpsusele, koos piisavate põhjendustega.

4. **VIITED**

1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Veebruar 1999.

2) G. Burdett ja G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 **JAOTUSKOEFITSIENT (SÜSTEEMIS 1-OKTANOOL-VESI): AEGLASE SEGAMISE MEETOD**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 123 (2006). Aeglase segamise meetodiga saab täpselt määrata jaotuskoefitsiente süsteemis 1-oktanool-vesi (P_{OW}) kuni log P_{OW} väärtuseni 8,2 (1). Sellepärast sobib see meetod väga hüdrofoobsete ainete P_{OW} otseseks katseliseks määramiseks.

2. Muud meetodid jaotuskoefitsientide määramiseks süsteemis 1-oktanool-vesi (P_{OW}) on loksutatava kolvi meetod (2) ja P_{OW} määramine pööratud faasi kõrgefektiivse vedelikkromatograafia retentsiooniaja andmetest (3). Loksutatava kolvi meetod võib anda aga vale tulemuse, kuna veefaasi kanduvad üle mikroskoopilised oktanooli piisakesed. Mida suurem on P_{OW} väärtus, seda rohkem kiputakse veefaasis olevate oktanooli mikropiiskade tõttu ülehindama uuritava aine kontsentratsiooni vees. Sellepärast võib loksutatava kolvi meetodit kasutada ainult ainete puhul, mille log $P_{OW} < 4$. Teine meetod põhineb otse määratud usaldusväärsetel P_{OW} väärtustel, mida kasutatakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia retentsiooniaja ja mõõdetud P_{OW} väärtuste vahelise seose kaliibrimiseks. Mõnda aega oli kättesaadav OECD katsejuhendi kavand (4) ioniseeruvate ainete jaotuskoefitsientide määramiseks süsteemis 1-oktanool-vesi, kuid seda meetodit enam ei kasutata.

3. Käesolev katsemeetod on välja töötatud Madalmaades. Siin kirjeldatud meetodite täpsust on kontrollitud ja optimeeritud laboritevaheliste võrdluskatsete uuringuga, milles osales 15 laborit (5).

LÄHTEKAALUTLUSED

Olulisus ja kasutamine

4. On kindlaks tehtud, et inertsete orgaaniliste ainete bioakumulatsioon kalades korreleerub väga tugevasti nende ainete jaotuskoefitsiendiga süsteemis 1-oktanool-vesi (P_{OW}). Lisaks on näidatud, et P_{OW} korreleerub kemikaalide toksilise mõjuga kaladele ning seostumisega tahkete ainetega, nagu pinnas ja setted. Ulatuslik ülevaade nendest seostest on esitatud publikatsioonis 6.

5. On kindlaks tehtud, et aine 1-oktanool-vee-süsteemi jaotuskoefitsiendi ja muude omaduste vahel on palju keskkonnatoksikoloogia ja -keemia seisukohast olulisi seoseid. Sellepärast on jaotuskoefitsient süsteemis 1-oktanool-vesi saanud tähtsaks parameetriks, mille abil hinnatakse kemikaalide keskkonnaohtlikkust ja ennustatakse nende käitumist keskkonnas.

Kasutusala

6. Aeglane segamine peaks vähendama 1-oktanooli mikropiisakeste moodustumist veefaasis olevatest 1-oktanooli tilkadest. Sellega välditakse aine kontsentratsiooni ülehindamist veefaasis mikropiiskades leiduvate uuritava aine molekulide tõttu. Seepärast on aeglase segamise meetod eriti sobiv P_{OW} määramiseks ainetel, mille eeldatav log P_{OW} väärtus on 5 või suurem ja mille puhul loksutatava kolvi meetod (2) võib anda vale tulemuse.

▼M4

MÕISTED JA ÜHIKUD

7. Aine jaotuskoefitsient vee ja lipofiilse lahusti (1-oktanool) vahel iseloomustab kemikaali tasakaalulist jaotumist kahe faasi vahel. Aine jaotuskoefitsient vee ja lipofiilse lahusti (1-oktanool) vahel (P_{OW}) on suhe, mis saadakse veega küllastunud 1-oktanooli faasis oleva uuritava aine tasakaalulise kontsentratsiooni (C_O) jagamisel 1-oktanooliga küllastunud veefaasis oleva uuritava aine tasakaalulise kontsentratsiooniga (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Kuna jaotustegur on kontsentratsioonide suhe, on see mõõtühikuta suurus. Enamasti väljendatakse seda kümnendlogaritmi kujul (log P_{OW}). P_{OW} sõltub temperatuurist, sellepärast tuleb andmete esitamisel märkida ka mõõtmistemperatuur.

MEETODI PÕHIMÕTE

8. Jaotuskoefitsiendi määramiseks tasakaalustatakse püsival temperatuuril omavahel vesi, 1-oktanool ja uuritav aine. Seejärel määratakse uuritava aine kontsentratsioon mõlemas faasis.

9. Siin kirjeldatavas aeglase segamise katses on võimalik vähendada eksperimentaalseid raskusi, mida loksutatava kolvi katses põhjustab mikropiiskade tekkimine. Aeglase segamise katses tasakaalustatakse vesi, 1-oktanool ja uuritav aine termostateeritavas ja segajaga varustatud katsenõus. Aine jaotumist faaside vahel kiirendab segamine. Segamine tekitab piiratud turbulentsi, mis kiirendab jaotumist 1-oktanooli ja vee vahel, kuid seejuures ei teki mikropiisku (1).

KATSE RAKENDATAVUS

10. Kuna lisandid võivad mõjutada uuritava aine aktiivsuskoefitsienti, määratakse jaotuskoefitsient ainult puhta aine jaoks. 1-oktanooli ja vee vahel jaotumise uurimisel tuleb kasutada müügilolevaid kõrgeima puhtusastmega kemikaale.

11. Käesolev meetod on rakendatav puhta aine korral, mis ei dissotsieeru, assotsieeru ega ole märkimisväärselt pindaktiivne. Meetodit võib kasutada selliste ainete ja nende segude 1-oktanooli ja vee vahel jaotumise suhte määramiseks. Kui meetodit kasutatakse segu puhul, on määratav 1-oktanooli ja vee vahel jaotumise suhe tinglik ja oleneb uuritava segu ning veefaasina kasutatava elektrolüüdi keemilisest koostisest. Täiendavate abinõude rakendamisel võib seda meetodit kasutada ka dissotsieeruvate või assotsieeruvate ühendite puhul (vt punkt 12).

12. Kuna dissotsieeruvate ainete, nagu orgaanilised happed, fenoolid, orgaanilised alused ja metallorgaanilised ühendid, jaotumisel 1-oktanooli ja vee vahel kujuneb vees ja 1-oktanoolis mitmeastmeline tasakaal, on jaotuskoefitsient süsteemis 1-oktanool-vesi tinglik konstant, mis sõltub tugevasti elektrolüüdi koostisest (7, 8). Seega eeldab jaotuskoefitsiendi määramine süsteemis 1-oktanool-vesi, et katse jooksul kontrollitakse pH väärtust ja elektrolüüdi koostist ning esitatakse need andmed. Nende jaotuskoefitsientide hinnangulise väärtuse saamiseks kasutatakse eksperdihindamist. Dissotsiatsioonikonstandi (-konstantide) alusel valitakse sobivad pH väärtused, et määrata iga ionisatsiooniastme jaotuskoefitsient. Metallorgaaniliste ühendite jaotumise uurimisel kasutatakse puhvreid, mis ei moodusta komplekse (8). Arvestades vesilahuste keemia andmeid (komplekside moodustumise tasakaalukonstandid, dissotsiatsioonikonstandid), valitakse katsetingimused nii, et oleks võimalik hinnata, millises vormis on uuritav aine veefaasis. Kõikide katsete puhul luuakse taustelektrolüüdi abil ühesugune ioonne jõud.

▼M4

13. Vees vähe lahustuvate või suure P_{OW} väärtusega ainete jaotuskoefitsiendi määramist võib raskendada see, et aine väikest kontsentratsiooni vees on raske täpselt määrata. Käesolevas metoodikas antakse juhendeid, kuidas seda probleemi lahendada.

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

14. Keemilised reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad või veelgi kõrgema puhtusastmega. Uuritava ainena soovitatakse kasutada teadaoleva keemilise koostisega vähemalt 99-protsendilise puhtusastmega radioaktiivse märgiseta aineid või teadaoleva keemilise koostise ja radiokeemilise puhtusastmega radioaktiivselt märgistatud aineid. Kui märgise poolestusaeg on lühike, tehakse isotoobi lagunemist arvestav parand. Radioaktiivse märgisega uuritava aine puhul tuleb ainespetsiifilise analüüsimeetodiga tõendada, et mõõdetav radioaktiivsus on otse seotud uuritava ainega.

15. log P_{OW} hinnangu saamiseks võib kasutada müügilolevat log P_{OW} hindamiseks ette nähtud tarkvara või kasutada kummaski lahustis lahustuvuste suhet.

16. Enne aeglase segamise katse korraldamist P_{OW} määramiseks peaks uuritava aine kohta teadma järgmist:

a) struktuurivalem,

b) analüüsimeetodid, mis sobivad uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks vees ja 1-oktanoolis,

c) ioniseeruva aine dissotsiatsioonikonstandid (OECD juhis 112 (9)),

d) lahustuvus vees (10),

e) abiootiline hüdrolüüs (11),

f) kiire biolagunduvus (12),

g) aururõhk (13).

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed ja aparatuur

17. Vaja on harilikku laborivarustust, eeskätt järgmisi vahendeid:

— magnetsegajad ja tefloniga kaetud segamispulgad, mida kasutatakse veefaasi segamiseks;

— analüüsiseadmed, mis võimaldavad määrata uuritava aine eeldatavaid kontsentratsiooni väärtusi;

— katsenõu, mille põhja juures on kraan. Olenevalt log P_{OW} hinnangulisest väärtusest ja uuritava aine avastamise lävest tuleb vajaduse korral kasutada suuremat kui üheliitrise mahuga, kuid samasuguse kujuga katsenõu, et saaks võtta piisava koguse vett uuritava aine keemiliseks eraldamiseks ja määramiseks. Nii saadakse aine veest eraldamisel suurema sisaldusega kontsentraat ja usaldusväärsem analüüsi tulemus. 1. liite tabelis on esitatud vajaliku minimaalse mahu hinnangud, uuritava aine avastamise läved, hinnangulised log P_{OW} väärtused ja lahustuvused vees. Tabel põhineb Pinsuwani jt (14) esitatud seosel ühelt poolt log P_{OW} ning teiselt poolt oktanoolis ja vees lahustuvuse (S) suhte vahel:

$$\log P_{OW} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$$

▼M4

kus

$SR = S_{oct}/S_w$ (väljendatud molaarsustes),

ning Lymani (15) esitatud valemil, mis võimaldab ennustada vesilahustuvust. 1. liites esitatud valemi abil arvutatud vesilahustuvust tuleb käsitada esialgse hinnanguna. Tuleb märkida, et käesoleva meetodi kasutaja võib hinnata vesilahustuvust ka mis tahes muu valemi abil, kui ta arvab, et see kajastab hüdrofoobsuse ja lahustuvuse seost paremini. Näiteks tahkete ühendite puhul on soovitatav lahustuvuse hindamisel arvestada ka sulamistemperatuuri. Kui kasutatakse modifitseeritud valemit, tuleb kontrollida, kas valem lahustuvuse arvutamiseks oktanoolis ikkagi kehtib. 2. liites on skemaatiliselt kujutatud klaasist veesärgiga katsenõu mahuga umbes üks liiter. 2. liites kujutatud nõu proportsioonid on osutunud sobivaks ja muu mahuga nõu peaks olema samasuguse kujuga;

— oluline on sellise seadme olemasolu, mis hoiab aeglase segamise katse jooksul püsivat temperatuuri.

18. Nõud peavad olema valmistatud inertsest materjalist, et adsorptsioon nõu pinnale oleks tähtsusetu.

Katselahuste valmistamine

19. P_{OW} määramiseks kasutatakse müügilolevat suurima puhtusastmega (vähemalt üle 99 %) 1-oktanooli. 1-oktanool soovitatakse puhastada happe, aluse ja veega ekstraheerimise abil ning seejärel kuivatada. Lisaks sellele võib 1-oktanooli puhastada destilleerimisega. Puhastatud 1-oktanooli kasutatakse uuritava aine standardlahuste valmistamiseks. P_{OW} määramiseks kasutatav vesi peab olema destilleeritud klaas- või kvartsklaasist seadme abil, saadud puhastussüsteemist või olema kõrgefektiivse vedelikkromatograafia puhul nõutava puhtusega. Destilleeritud vesi filtritakse läbi filtri, mille poori suurus on 0,22 μm, ja tehakse pimekatsed, millega kontrollitakse, et kontsentreeritud ekstraktis ei oleks uuritava aine käitumist mõjutavaid lisandeid. Klaaskiudfiltri kasutamisel puhastatakse see eelnevalt kuumutamisega vähemalt kolme tunni jooksul 400 °C juures.

20. Enne katset küllastatakse mõlemad lahustid vastastikku, tasakaalustades neid piisavalt suures nõus. Selleks segatakse kahefaasilist süsteemi aeglaselt kahe ööpäeva jooksul.

21. Valitakse vajalik uuritava aine kontsentratsioon ja aine lahustatakse veega küllastunud 1-oktanoolis. Jaotuskoefitsient süsteemis 1-oktanool-vesi tuleb määrata lahja 1-oktanool- ja vesilahuse jaoks. Sellepärast ei tohi uuritava aine kontsentratsioon ületada 70 % selle lahustuvusest kummaski faasis ega olla suurem kui 0,1 (1). Katses kasutatavas 1-oktanooli lahuses ei tohi olla uuritava aine hõljuvaid tahkeid osakesi.

22. Vajalik kogus uuritavat ainet lahustatakse veega küllastunud 1-oktanoolis. Kui võib arvata, et log P_{OW} väärtus on suurem kui viis, tuleb hoolikalt jälgida, et katses kasutatavad 1-oktanooli lahused ei sisaldaks uuritava aine hõljuvaid tahkeid osakesi. Nende ainete puhul, mille log $P_{OW} > 5$, toimitakse seepärast järgmisel viisil:

— uuritav aine lahustatakse veega küllastunud 1-oktanoolis;

▼M4

— lahusel lastakse piisavalt kaua seista, et hõljuv aine sadestuks. Sadestumise ajal jälgitakse uuritava aine kontsentratsiooni;

— kui 1-oktanooli lahuses mõõdetav kontsentratsioon on saavutanud püsiva väärtuse, lahjendatakse põhilahus vajaliku mahu 1-oktanooli lisamisega;

— mõõdetakse lahjendatud põhilahuse kontsentratsioon. Lahjendatud põhilahust võib aeglase segamise katses kasutada, kui mõõdetud kontsentratsiooni väärtus vastab lahjendusele.

Proovide ekstraheerimine ja analüüsimine

23. Uuritava aine määramiseks kasutatakse valideeritud analüüsimeetodit. Uurija peab esitama tõendid, et katses kasutatavad uuritava aine kontsentratsioonid veega küllastunud 1-oktanoolis ja 1-oktanooliga küllastunud vees on suuremad kui kasutatava analüüsimeetodi mõõtmislävi. Kui on vaja kasutada ekstraheerimismeetodit, tuleb enne katset kindlaks teha vee faasis ja 1-oktanooli faasis oleva uuritava aine analüütilise määramise saagis. Analüüsiks kasutatava signaali tugevus peab olema parandatud pimekatses saadud signaali arvestamiseks; hoolikalt jälgitakse, et analüüsitavat ainet ei kantaks üle ühest proovist teise.

24. Kuna hüdrofoobse uuritava aine kontsentratsioon vee faasis on väike, on vee faasi enne analüüsi tõenäoliselt vaja ekstraheerida orgaanilise lahustiga ja ekstrakti kontsentreerida. Samal põhjusel on vaja kontsentreerida võimalikke pimekatseid. Selleks tuleb kasutada kõrgpuhtaid lahusteid, eelistatavalt selliseid, mis sobivad kasutamiseks jääkide analüüsis. Töötamine hoolikalt puhastatud (lahustiga pestud või kõrgel temperatuuril kuumutatud) klaasnõudega aitab vältida ühe proovi saastamist teise prooviga.

25. log P_{OW} hinnangulise väärtuse saamiseks võib kasutada hindamisprogrammi või eksperdihindamist. Kui hinnangu järgi on väärtus suurem kui kuus, tuleb pimekatse parandite arvestamisel ja analüüsitava aine võimaliku ülekande vältimisel olla eriti hoolikas. Kui hinnanguline log P_{OW} on suurem kui kuus, tuleb määramise saagist arvestava parandi saamiseks kasutada asendavat standardainet, nii et oleks võimalik saavutada suurt eelkontsentreerimistegurit. Müügil on mitu P_{OW} hindamiseks ette nähtud tarkvaraprogrammi, ([1]) nt Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) ja ACD log P (19). Hindamisviise on kirjeldatud publikatsioonides 20–22.

26. Tunnustatud meetodite abil tehakse kindlaks uuritava aine mõõtmisläve väärtused 1-oktanoolis ja vees. Rusikareeglina võib meetodi mõõtmisläve määratleda kui uuritava aine sellist kontsentratsiooni vees või 1-oktanoolis, mille puhul signaali ja müra taseme suhe on kümme. Valitakse sobiv ekstraheerimise ja eelkontsentreerimise meetod ning leitakse analüütilise määramise saagis. Analüütiliseks määramiseks vajaliku tugevusega signaali saamiseks valitakse sobiv eelkontsentreerimistegur.

([1]) See teave on ette nähtud üksnes kasutaja abistamiseks. Võib kasutada ka muid samaväärseid arvutiprogramme, kui saab näidata, et need annavad samad tulemused.

▼M4

27. Analüüsimeetodi parameetrite ja oodatavate kontsentratsioonide alusel määratakse kindlaks ligikaudne proovi maht, mis on vajalik uuritava aine täpseks määramiseks. Tuleb vältida liiga väikeste veeproovide kasutamist, mis ei anna piisavalt tugevat analüütilist signaali. Tuleb hoiduda ka ülemäära suurte veeproovide võtmisest, kuna sel juhul võib vett mitte jätkuda nõutava minimaalse arvu (n = 5) analüüside tegemiseks. 1. liites on esitatud proovi väikseima mahu sõltuvus nõu mahust, uuritava aine avastamise lävest ja lahustuvusest.

28. Uuritava aine sisaldus mõõdetakse selle aine kaliibrimiskõveraga võrdlemise teel. Standardproovide kontsentratsioonivahemik peab ulatuma uuritava proovi kontsentratsioonist mõlemale poole.

29. Kui uuritava aine hinnanguline log P_{OW} väärtus on suurem kui kuus, tuleb enne ekstraheerimist lisada veeproovile asendavat standardainet, et osata arvesse võtta kadusid veeproovi ekstraheerimisel ja eelkontsentreerimisel. Määramise saagist arvestava parandi õige väärtuse saamiseks peavad asendava standardaine omadused olema uuritava aine omadustega väga sarnased või identsed. Selleks kasutatakse eelistatavalt (stabiilsete) isotoopidega (nt deuteerium või ^{13}C) märgistatud uuritava aine analooge. Kui stabiilsete isotoopidega (nt deuteerium või ^{13}C) märgistatud analooge kasutada ei saa, tuleb usaldusväärsete kirjandusandmete põhjal näidata, et asendava standardaine füüsikalis-keemilised omadused on väga sarnased uuritava aine omadustega. Vee faasi ekstraheerimisel lahustiga võib moodustuda emulsioon. Emulsiooni vähendamiseks võib lisada soola ja lasta faasidel eralduda järgmise päevani. Ekstraheerimiseks ja proovide eelkontsentreerimiseks kasutatud meetodid märgitakse katseprotokolli.

30. Vajaduse korral võib enne analüüsi 1-oktanooli faasist võetud proovi lahjendada sobiva lahustiga. Asendava standardaine lisamine saagist arvestava parandi saamiseks on soovitatav ka siis, kui uuritava aine saagisekatsete tulemused on väga varieeruvad (suhteline standardhälve > 10 %).

31. Analüüsimeetodi üksikasjad märgitakse katseprotokolli. Nende hulka kuuluvad ekstraheerimismeetod, eelkontsentreerimis- ja lahjendustegur, analüüsiseadme parameetrid, kaliibrimismeetod, kaliibrimise kontsentratsioonivahemik, vee faasis oleva uuritava aine määramise saagis, asendava standardaine lisamine saagist arvestava parandi saamiseks, fooni tase, avastamislävi ja mõõtmislävi.

Katse läbiviimine

Optimaalne 1-oktanooli ja vee mahu suhe

32. Vee ja 1-oktanooli mahtude valimisel tuleb arvestada mõõtmisläve väärtust 1-oktanoolis ja vees, veeproovide puhul kasutatavaid eelkontsentreerimistegureid, 1-oktanooli ja vee prooviks võetavaid koguseid ja eeldatavaid kontsentratsioone. Tehnilistel põhjustel valitakse 1-oktanooli maht aeglaselt segatavas süsteemis selliselt, et 1-oktanooli kiht oleks küllalt paks (üle 0,5 cm), nii et 1-oktanooli faasist saaks võtta proovi seda faasi häirimata.

33. Ühendite puhul, mille log P_{OW} on 4,5 või suurem, kasutatakse tavaliselt järgmist faaside suhet: üheliitrisse nõusse pannakse 950–980 ml vett ja 20–50 ml 1-oktanooli.

▼M4

Katsetingimused

34. Katse ajal termostateeritakse katsenõu nii, et temperatuurikõikumised on väiksemad kui 1 °C. Katse tuleb teha 25 °C juures.

35. Katsesüsteemi kaitsmiseks päevavalguse eest tehakse katse pimedas ruumis või kaetakse katsenõu alumiiniumfooliumiga.

36. Katse tehakse võimalikult tolmuvabas keskkonnas.

37. 1-oktanooli ja vee süsteemi segatakse tasakaalu saabumiseni. Tasakaalustamisaja hindamiseks tehakse eeluuring, mille jooksul süsteemi segatakse aeglaselt ning võetakse perioodiliselt 1-oktanoolist ja veest proove. Proove võetakse mitte sagedamini kui viie tunni tagant.

38. Iga P_{OW} määramiseks tehakse vähemalt kolm sõltumatut aeglase segamise katset.

Tasakaalustamisaja määramine

39. Eeldatakse, et tasakaal on saabunud, kui 1-oktanooli faasi ja veefaasi kontsentratsioonide suhte ja aja regressioonisirge tõus nelja järjestikuse proovivõtu ulatuses ei erine oluliselt nullist usaldusnivool 0,05. Enne proovivõtu alustamist tasakaalustatakse süsteemi vähemalt üks ööpäev. Kogemused näitavad, et kui aine hinnanguline log P_{OW} väärtus on alla viie, saab proovid võtta teisel ja kolmandal päeval. Hüdrofoobsemate ühendite puhul võib tasakaalustamine kesta kauem. Ühendi puhul, mille log P_{OW} väärtus on 8,23 (dekaklorobifenüül), oli piisav tasakaalustamisaeg 144 tundi. Tasakaalu hindamiseks võetakse korduvalt proove ühest nõust.

Katse alustamine

40. Katse alguses täidetakse katsenõu veega, mis on küllastunud 1-oktanooliga. Püsiva temperatuuri saavutamiseks termostateeritakse katsenõu piisava aja jooksul.

41. Katsenõusse lisatakse ettevaatlikult vajalik kogus uuritavat ainet, mis on eelnevalt lahustatud sobivas mahus veega küllastunud 1-oktanoolis. See etapp on väga oluline, kuna siin tuleb vältida kahe faasi turbulentset segunemist. Selleks võib 1-oktanooli faasi lisada aeglaselt pipetiga, hoides pipetti vastu katsenõu seina veefaasi pinna läheduses. 1-oktanooli faas voolab mööda klaasseina, moodustades veefaasi peale kihi. Mingil juhul ei tohi 1-oktanooli kallata otse katsenõusse; 1-oktanooli tilgad ei tohi kukkuda otse vette.

42. Pärast segamise alustamist tõstetakse segamise kiirust aeglaselt. Kui segaja mootorit ei saa vajalikul määral reguleerida, tuleb kasutada trafot. Segamise kiirus reguleeritakse selliseks, et vee ja 1-oktanooli piirpinnal tekiks 0,5–2,5 cm sügavune keeris. Kui keerise sügavus ületab 2,5 cm, tuleb segamise kiirust vähendada; vastasel korral võivad 1-oktanooli tilkadest veefaasis tekkida mikropiisakesed, mille tagajärjel uuritava aine kontsentratsiooni vees hinnatakse tegelikust suuremaks. Maksimaalselt 2,5 cm sügavusele keerisele vastavat segamiskiirust soovitatakse laboritevaheliste võrdluskatsete tulemuste alusel (5). See on kompromiss, mis võimaldab 1-oktanooli mikropiiskade tekke piiramisega samal ajal süsteemi kiiresti tasakaalustada.

▼M4

Proovi võtmine ja ettevalmistamine

43. Enne proovi võtmist peatatakse segaja ja oodatakse, kuni vedelike liikumine lakkab. Kui proovid on võetud, pannakse segaja uuesti aeglaselt tööle, nagu eespool kirjeldatud, ja seejärel suurendatakse järk-järgult segamise kiirust.

44. Vee proove võetakse katsenõu alumises osas oleva kraani kaudu. Kraani sees olev tasakaalustamata veekogus visatakse alati ära (2. liites kujutatud nõu puhul on selle maht umbes 5 ml). Kraani sees olev vesi ei segune ülejäänud faasiga ega ole sellepärast tasakaalus. Registreeritakse veeproovide mahud ja jälgitakse, et massibilansi koostamisel võetaks arvesse ka äravisatud vees leiduv uuritava aine kogus. Aurumiskao vähendamiseks lastakse veel rahulikult voolata jaotuslehtrisse, nii et vee- ja 1-oktanoolikihi olekut ei häiritaks.

45. 1-oktanooli proove võetakse 1-oktanooli kihist väikeste alikvootide (umbes 100 µl) kaupa 100-mikroliitrise tervenisti klaasist ja metallist süstla abil. Seejuures jälgitakse, et ei häiritaks faasidevahelist piirpinda. Registreeritakse proovide mahud. Väiksest alikvoodist piisab, kuna 1-oktanooli proovi lahjendatakse.

46. Tuleb vältida asjatuid proovi ülekandmisi. Seepärast määratakse proovi maht gravimeetriliselt. Veeproovi puhul saab seda teha nii, et proov võetakse jaotuslehtrisse, millesse on enne pandud vajalik kogus lahustit.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

47. Käesoleva katsemetoodika kohaselt tehakse P_{OW} määramiseks uuritava ainega ühesugustes tingimustes kolm aeglase segamise katset (kolm paralleelkatset). Tasakaalu saavutamist näitav regressioonikõver peab põhinema C_O/C_W määramisel vähemalt neljas järjestikuses eri aegadel võetud proovis. See võimaldab arvutada dispersiooni, mis iseloomustab paralleelkatsetest leitud keskväärtuse määramatust.

48. P_{OW} väärtust võib iseloomustada igast paralleelkatsest saadud andmete dispersiooni abil. Neid andmeid kasutatakse kaalutud keskmise P_{OW} väärtuse arvutamiseks üksikute paralleelkatsete tulemuste alusel. Selleks kasutatakse statistilise kaaluna paralleelkatsete tulemuste dispersiooni pöördväärtust. Suure hajuvusega (suure dispersiooniga) ja seega vähem usaldatavad andmed mõjutavad kaalutud keskmist tulemust vähem kui väiksema dispersiooniga andmed.

49. Samal viisil arvutatakse ka kaalutud standardhälve. See iseloomustab P_{OW} määramise korratavust. Kaalutud standardhälbe väike väärtus näitab, et P_{OW} määramise tulemus on ühes ja samas laboratooriumis hästi korratav. Järgnevalt on kirjeldatud katseandmete formaalstatistilist analüüsi.

▼M4

Tulemuste töötlemine

Tasakaalu saavutamise näitamine

50. Iga proovivõtuhetke jaoks arvutatakse 1-oktanoolis ja vees määratud uuritava aine kontsentratsioonide suhte logaritm (log C_O/C_W). Tasakaalu saavutamise näitamiseks ehitatakse graafik, mis kajastab selle suhte sõltuvust ajast. Kui vähemalt nelja proovi tulemused moodustavad graafikul platoo, tähendab see, et tasakaal on saavutatud ja uuritav aine on 1-oktanoolis tõesti lahustunud. Kui kõnesolevat platood ei ole, jätkatakse katset, kuni nelja järjestikuse proovi tulemused annavad tõusu, mis ei erine oluliselt 0-st usaldusnivool 0,05, näidates, et log C_O/C_W ei sõltu ajast.

Log P_{OW} arvutamine

51. Iga paralleelkatse log P_{OW} saamiseks arvutatakse kaalutud keskmine log C_O/C_W väärtus kõvera log C_O/C_W *vs*. aeg tasakaaluolekule vastaval osal. Kaalutud keskmise arvutamisel kaalutakse katseandmeid dispersiooni pöördväärtusega; selle tulemusena on katseandmete mõju lõpptulemusele pöördvõrdeline nende määramatusega.

Keskmine log P_{OW}

52. log P_{OW} keskväärtuse arvutamiseks eri paralleelkatsete keskväärtustest leitakse vastavate dispersioonidega kaalutud paralleelkatsete tulemuste keskmine.

Arvutused tehakse järgmiselt:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

kus

$\log P_{OW,i}$ = on paralleelkatses i leitud log P_{OW} väärtus,

$\log P_{OW,Av}$ = on üksikutes paralleelkatsetes määratud log P_{OW} väärtuste kaalutud keskmine,

w_i = on paralleelkatses i log P_{OW} väärtusele omistatud statistiline kaal.

Statistilise kaaluna w_i kasutatakse log $P_{OW,i}$ dispersiooni pöördväärtust ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. log P_{OW} keskväärtuse viga hinnatakse tasakaaluolekus üksikutes paralleelkatsetes määratud log C_O/C_W väärtuste korratavuse järgi. See väljendatakse log $P_{OW,Av}$ kaalutud standardhälbena ($\sigma_{\log\ Pow,Av}$), mis omakorda on log $P_{OW,Av}$ väärtusega seotud vea mõõt. Kaalutud standardhälbe võib arvutada kaalutud dispersioonist ($var_{\log\ Pow,Av}$) järgmisel viisil:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log\ Pow,Av})^{0,5}$$

n on paralleelkatsete arvu tähis.

▼M4

Katseprotokoll

54. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav aine:

— tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (mis näitab märgistuse asukohta, kui kasutatakse radioaktiivselt märgistatud ainet) ja olulised füüsikalis-keemilised omadused (vt punkt 17);

— uuritava aine puhtusaste (lisandid);

— märgistatud kemikaali märgise puhtus ja molaarne aktiivsus (vajaduse korral);

— log P_{OW} esialgne hinnanguline väärtus ja selle tuletusviis.

Katsetingimused:

— uuringu kuupäevad;

— katsetemperatuur;

— 1-oktanooli ja vee maht katse alguses;

— võetud 1-oktanooli ja vee proovide maht;

— pärast proovide võtmist katsenõusse jäänud 1-oktanooli ja vee maht;

— katsenõu ja segamistingimuste kirjeldus (segamispulga ja katsenõu ehitus, keerise sügavus millimeetrites ja segamiskiirus, kui see on teada);

— uuritava aine määramiseks kasutatud analüüsimeetod ja selle meetodi mõõtmislävi;

— proovivõtuajad;

— vee faasi ja kasutatud puhvrite pH (kui ioniseeruvate molekulide tõttu reguleeriti pH väärtust);

— paralleelkatsete arv.

Tulemused:

— kasutatud analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus;

— 1-oktanoolis ja vees määratud uuritava aine kontsentratsioonide sõltuvus ajast;

— massibilansi kontroll;

— katsetemperatuur ja selle standardhälve või katsetemperatuuri vahemik;

— kontsentratsioonide suhte ja aja seost kajastav regressioonikõver;

— keskväärtus log $P_{OW,Av}$ ja selle standardhälve;

— tulemuste arutelu ja tõlgendus;

▼M4

— representatiivse analüüsi originaalarvandmete näidis (hea laboritava kohaselt säilitatakse kõik originaalandmed), kaasa arvatud asendavate standardainete saagised, kaliibrimisel kasutatud kontsentratsioonide arv (koos kaliibrimiskõvera korrelatsioonikordaja kriteeriumidega) ning kvaliteedi tagamise ja/või kontrolli tulemused;

— kui on olemas, siis: mõõtmismeetodi valideerimisaruanne (esitatakse kirjandusviitena).

KIRJANDUS

1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the „slow-stirring" method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499–512.

2) Käesoleva lisa peatükk A.8. Jaotuskoefitsient.

3) Käesoleva lisa peatükk A.8. Jaotuskoefitsient.

4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596–2602.

9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

10) Käesoleva lisa peatükk A.6. Lahustuvus vees.

11) Käesoleva lisa peatükk C.7. Lagunemine – abiootiline lagunemine hüdrolüüsi teel sõltuvalt pH-st.

12) Käesoleva lisa peatükk C.4, II–VII osa (meetodid A–F). Kiire biolagunevuse määramine.

13) Käesoleva lisa peatükk A.4. Aururõhk.

14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623–626.

15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2–1 to 2–52.

16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479–488.

22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.

▼M4

1. liide

Eri log P_{OW} väärtusega uuritavate ainete veefaasis määramiseks vajalike vee miinimumkoguste arvutamise tabel

Eeldused

— Ühe alikvoodi maksimaalne maht on 10 % üldmahust, 5 alikvooti on 50 % üldmahust.

— Uuritava aine kontsentratsioon on 70 % lahustuvusest kummaski faasis. Väiksema kontsentratsiooni puhul on vaja kasutada veel suuremat mahtu.

— Avastamisläve juures määramiseks vajalik maht on 100 ml.

— Uuritavatel ainetel on mõistlikud log P_{ow} *vs*. log S_w ja log P_{ow} *vs*. SR (S_{oct}/S_w) sõltuvused.

S_w hindamine

log P_{ow}	Võrrand	log S_w	S_w (mg/l)
4	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	0,496	3,133E+00
4,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	0,035	1,084E+00
5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	–0,426	3,750E–01
5,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	–0,887	1,297E–01
6	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	–1,348	4,487E–02
6,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	–1,809	1,552E–02
7	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	–2,270	5,370E–03
7,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	–2,731	1,858E–03
8	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	–3,192	6,427E–04

S_{oct} hindamine

log P_{ow}	Võrrand	S_{oct} (mg/l)
4	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,41	3,763E+04
4,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,42	4,816E+04
5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,43	6,165E+04
5,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,44	7,890E+04
6	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,45	1,010E+05
6,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,46	1,293E+05
7	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,47	1,654E+05
7,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,48	2,117E+05
8	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,49	2,710E+05

▼**M4**

Uuritava aine üldmass (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{H2O}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Konts_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Konts_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Mahtude arvutamine

Veefaasi väikseim vajalik maht avastamisläve eri väärtuste korral

log K_{ow}	Avastamislävi (mikrogramm/l)	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Avastamisläve juures määramiseks vajalik maht (l)	0,1					

Selgitused arvutuste kohta

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 1-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 2-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 5-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 10-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Ületab 10 % isegi 10-liitrise katsenõu mahust.

▼M4

Vajaliku mahu sõltuvus lahustuvusest vees ja log P_{OW} väärtusest

Veefaasi väikseim vajalik maht avastamisläve eri väärtuste korral (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	Avastamislävi (mikrogramm/l) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

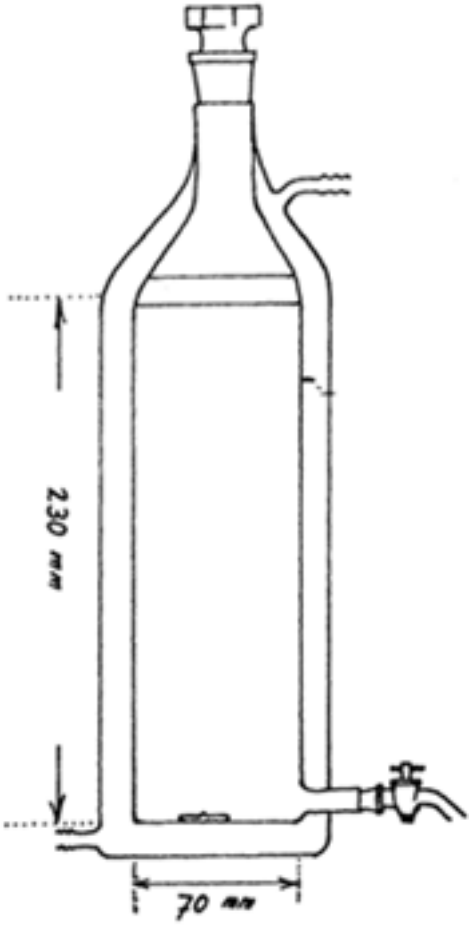
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	Avastamislävi (mikrogramm/l) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Avastamisläve juures määramiseks vajalik maht (l) on		0,1					

▼M4

2. liide

Klaasist veesärgiga katsenõu P_{OW} määramiseks aeglase segamise katse abil



▼**M6**

A.24. JAOTUSKOEFITSIENT (*N*-OKTANOOL/VESI): KÕRGEFEKTIIVSE VEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) MEETOD

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 117 (2004).

1. Jaotuskoefitsient (P) on määratletud kui kahest omavahel praktiliselt segunematust lahustist koosnevas kahefaasilises süsteemis lahustunud aine tasakaalukontsentratsioonide suhe. Lahustite *n*-oktanooli ja vee puhul:

$$P_{ow} = \frac{C_n - oktanool}{C_{vesi}}.$$

Kuna jaotuskoefitsient on kahe kontsentratsiooni suhtarv, puudub sellel mõõtühik ning seda väljendatakse tavaliselt suhtarvu kümnendlogaritmina.

2. P_{ow} on oluline näitaja, mille abil kirjeldatakse keemiliste ainete käitumist keskkonnas. On tõendatud, et esineb väga tugev seos ainete ioniseerimata vormi P_{ow} ja nende ainete kalades bioakumuleerumise vahel. Samuti on leitud, et P_{ow} on kasulik näitaja ainete pinnases ja setetes adsorbeerumise ennustamiseks ning ainete struktuuri ja toime vahelise kvantitatiivse seose kindlakstegemiseks paljude erinevate bioloogilise mõju viiside puhul.

3. Algne ettepanek selle katsemeetodi kasutamiseks põhineb C. V. Eadsforthi ja P. Moseri artiklil (1). Katsemeetodi väljatöötamist ja OECD laboritevahelise võrdlusuuringu tegemist kooskõlastas 1986. aastal Saksamaa Liitvabariigi asutus Umweltbundesamt (2).

LÄHTEKAALUTLUSED

4. Log P_{ow} väärtused vahemikus – 2 kuni 4 (vahel kuni 5 või rohkem) ([1]) saab eksperimentaalselt kindlaks teha loksutamismeetodil (käesoleva lisa peatükk A.8, OECD katsejuhend nr 107). HPLC-meetod võimaldab määrata log P_{ow} väärtusi vahemikus 0–6 (1, 2, 3, 4, 5). Selle meetodi puhul võib olla vaja hinnata P_{ow} väärtust, et valida sobivad võrdlusained ja toetada saadavate katsetulemuste põhjal tehtavaid järeldusi. Arvutusmeetodeid kirjeldatakse lühidalt selle katsemeetodi liites. Kasutatakse isokraatilist HPLC töörežiimi.

5. P_{ow} väärtus sõltub keskkonnatingimustest, näiteks temperatuurist, pH-st, ioonsest jõust jne, ning need katsetingimused tuleks kindlaks määrata, et P_{ow} andmeid oleks võimalik õigesti tõlgendada. Ioniseeritavate ainete puhul võib kasutusele tulla teinegi meetod (nt kavandatav OECD juhend pH mõõtmisel põhineva meetodi kohta ioniseeritud ainete jaoks (6)), mida saaks kasutada alternatiivmeetodina. Ehkki kõnealune kavandatav OECD juhend võib sobida selliste ioniseeritavate ainete P_{ow} määramiseks, on mõnel juhul asjakohasem kasutada HPLC-meetodit, mille puhul lähtutakse keskkonnas esinevatest pH väärtustest (vt punkt 9).

([1]) Ülempiir on määratud vajadusega saavutada täielik faaside eraldumine pärast jaotumistasakaalu muutmist ja enne analüüsimiseks proovide võtmist. Hoolikalt tehtud katse puhul võib ülempiiriks olla suurem P_{ow} väärtus.

▼**M6**

MEETODI PÕHIMÕTE

6. Pöördfaasilise HPLC jaoks kasutatakse analüütilisi kolonne, mis on täidetud müügiloleva tahke täidisega, mis sisaldab ränidioksiidiga kovalentselt seotud pikki süsivesinikuahelaid (nt C_8, C_{18}).

7. Sellisesse kolonni süstitud kemikaal jaotub liikuvas faasis piki kolonni edasikandumisel liikuva lahustifaasi ja liikumatu süsivesinikufaasi vahel. Ainete jaotumine toimub proportsionaalselt nende jaotuskoefitsiendiga süsteemis süsivesinik/vesi ning sellest tulenevalt elueeritakse hüdrofiilsed ained esimesena ja lipofiilsed ained viimasena. Retentsiooniaega kirjeldab mahtuvustegur k, mis arvutatakse järgmise võrrandiga:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0},$$

kus t_R on uuritava aine retentsiooniaeg ja t_0 on surnud aeg, st keskmine aeg, mille jooksul lahustimolekul läbib kolonni. Kvantitatiivsete analüüsimeetodite kasutamine ei ole vajalik, tuleb kindlaks teha üksnes retentsiooniaeg.

8. Uuritava aine jaotuskoefitsiendi arvutamiseks süsteemis oktanool/vesi määratakse katseliselt mahtuvustegur k ning sisestatakse see siis järgmisse võrrandisse:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k,$$

kus

a ja b on lineaarse regressiooni kordajad.

Selle võrrandi lahendamiseks leitakse regressioonanalüüsi teel lineaarne seos süsteemis oktanool/vesi täheldatava võrdlusainete jaotuskoefitsiendi logaritmi ja nende võrdlusainete mahtuvusteguri logaritmi vahel.

9. Pöördfaasilisel HPLC-l põhinev meetod võimaldab määrata jaotuskoefitsiendi P_{ow} logaritmitud väärtusi vahemikus 0–6, ent meetodi ulatust on erandjuhul võimalik laiendada kuni log P_{ow} vahemikuni 6–10. Sel juhul võib olla vaja modifitseerida liikuvat faasi (3). Kõnealune meetod ei ole kasutatav tugevate hapete ja aluste, metallikomplekside, elueerimiseks kasutatava lahusega reageerivate ainete või pindaktiivsete ainete puhul. Ioniseeritavate ainete puhul saab mõõta nende ioniseerimata vormi (vaba hape või vaba alus) üksnes juhul, kui kasutatakse sobivat puhvrit, mille pH on väiksem kui vaba happe pK_a või suurem kui vaba aluse pK_a. Ioniseeritavate ainete analüüsimiseks võib kasutusele tulla ka pH mõõtmisel põhinev meetod (6), mida saaks kasutada alternatiivmeetodina (6). Kui log P_{ow} väärtus määratakse keskkonnaohtlikkuse alusel klassifitseerimiseks või keskkonnaohu hindamiseks, tuleks katse teha pH väärtuste vahemikus, mis vastab looduskeskkonnas esinevatele pH väärtustele, st vahemikus 5,0–9,0.

10. Mõnel juhul võivad lisandid raskendada tulemuste tõlgendamist, kuna piike ei saa enam üheselt identifitseerida. Lahutamata jäänud piikidega segu puhul tuleks esitada log P_{ow} ülem- ja alampiir ning igale log P_{ow} väärtusele vastava piigi protsentuaalne pindala. Homoloogsete ainete rühmast koosneva segu puhul tuleks märkida ka kaalutud keskmine log P_{ow} (7), mis on arvutatud iga üksiku P_{ow} väärtuse ja sellele vastava piigi protsentuaalse pindala põhjal (8). Arvutustes tuleks arvesse võtta kõiki piike, mille pindala on vähemalt 5 % piikide kogupindalast (9):

▼**M6**

$$kaalutud\ \ keskmine\ \log\ P_{ow} = \frac{\sum_i (\log\ P_{owi})(pindala\ (\%))}{piikide\ \ kogupindala\ (\%)} = \frac{\sum (log\ \ P_{owi})(pindala\ (\%)_i)}{\sum_i pindala\ (\%)}.$$

Kaalutud keskmine log P_{ow} kehtib üksnes homoloogidest (nt alkaanidest) koosneva aine või segu (nt tallõli) kohta. Segu mõõtmisel võib mõtestatud tulemusi saada juhul, kui kasutatava analüütilise detektori tundlikkus on kõikide segus sisalduvate ainete suhtes ühesugune ja neid aineid on võimalik üksteisest piisavalt lahutada.

TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

11. Enne meetodi kasutamist peaks olema teada aine dissotsiatsioonikonstant, struktuurivalem ja lahustuvus liikuvas faasis. Peale selle oleks abiks teave aine hüdrolüüsi kohta.

KVALITEEDIKRITEERIUMID

12. Mõõtmistulemuste usaldusväärsuse suurendamiseks tuleb iga mõõtmist teha kaks korda.

— Korratavus: identsetes katsetingimustes ja sama võrdlusainete rühmaga tehtud korduvmõõtmistel saadud log P_{ow} väärtused ei tohiks logaritmskaalal erineda rohkem kui ± 0,1 ühikut.

— Reprodutseeritavus: mõõtmiste kordamisel erineva võrdlusainete rühmaga võidakse saada erinevad tulemused. Tavaliselt on log k ja log P_{ow} vahelist seost väljendava korrelatsioonikordaja R väärtus katses kasutatavate ainete rühma puhul umbes 0,9, mis vastab oktanool-vee jaotuskoefitsiendi log P_{ow} varieeruvusele ± 0,5 logaritmilist ühikut.

13. Laboritevahelisest võrdlusuuringust on selgunud, et HPLC-meetodiga saadud log P_{ow} väärtused erinevad loksutamismeetodiga saadud väärtustest kuni ± 0,5 ühikut (2). Kirjandusest võib leida ka muid võrdlusandmeid (4, 5, 10, 11, 12). Kõige täpsemad tulemused saadakse struktuurilt lähedastel võrdlusainetel põhinevate korrelatsioonigraafikute kasutamisel (13).

VÕRDLUSAINED

14. Aine mõõdetud mahtuvusteguri k korreleerimiseks aine P_{ow}-ga tuleb koostada vähemalt kuuest punktist koosnev kaliibrimisgraafik (vt punkt 24). Katse tegija valib ise sobivad võrdlusained. Võrdlusainete log P_{ow} väärtused peaksid üldjuhul moodustama vahemiku, mis hõlmab uuritava aine log P_{ow} väärtust, st vähemalt ühe võrdlusaine P_{ow} peaks olema suurem kui uuritaval ainel ja vähemalt ühe võrdlusaine P_{ow} peaks olema uuritava aine omast väiksem. Ekstrapoleerimist tuleks kasutada ainult erandjuhul. Sellised võrdlusained peaksid eelistatult olema oma struktuurilt uuritava ainega sarnased. Kaliibrimiseks kasutatavad võrdlusainete log P_{ow} väärtused peaksid põhinema usaldusväärsetel katseandmetel. Ainete puhul, mille log P_{ow} väärtus on suur (tavaliselt üle 4), võib usaldusväärsete katseandmete puudumisel kasutada siiski ka arvutatud väärtusi. Ekstrapoleeritud väärtuste kasutamisel tuleks märkida ülempiir.

15. On olemas log P_{ow} väärtuste ulatuslikud loetelud paljude kemikaalirühmade kohta (14, 15). Kui struktuurilt sarnaste ainete jaotuskoefitsiente käsitlevad andmed ei ole kättesaadavad, võib kasutada muudel võrdlusainetel põhinevat üldisemat kaliibrimist. Soovitatavad võrdlusained ja nende P_{ow} väärtused on loetletud tabelis 1. Ioniseeritavate ainete kohta esitatud väärtused kehtivad ioniseerimata vormi puhul. Esitatud väärtuste usaldusväärsust ja kvaliteeti on kontrollitud laboritevahelise võrdlusuuringu käigus.

▼**M6**

Tabel 1.

Soovitatavad võrdlusained.

	CASi number	Võrdlusaine	log P_{ow}	pK_a
1	78-93-3	2-butanoon (metüületüülketoon)	0,3	
2	1122-54-9	4-atsetüülpüridiin	0,5	
3	62-53-3	Aniliin	0,9	
4	103-84-4	Atseetaniliid	1,0	
5	100-51-6	Bensüülalkohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoksüfenool	1,3	pK_a = 10,26
7	122-59-8	Fenoksüäädikhape	1,4	pK_a = 3,12
8	108-95-2	Fenool	1,5	pK_a = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenool	1,5	pK_a = 3,96
10	100-47-0	Bensonitriil	1,6	
11	140-29-4	Fenüülatsetonitriil	1,6	
12	589-18-4	4-metüülbensüülalkohol	1,6	
13	98-86-2	Atsetofenoon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenool	1,8	pK_a = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobensoehape	1,8	pK_a = 3,47
16	106-47-8	4-kloroaniliin	1,8	pK_a = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenseen	1,9	
18	104-54-1	Tsinnamüülalkohol (kaneelalkohol)	1,9	
19	65-85-0	Bensoehape	1,9	pK_a = 4,19
20	106-44-5	*p*-kresool	1,9	pK_a = 10,17
21	140-10-3 (*trans*)	Kaneelhape	2,1	pK_a = 3,89 (*cis*) 4,44 (*trans*)
22	100-66-3	Anisool	2,1	
23	93-58-3	Metüülbensoaat	2,1	
24	71-43-2	Benseen	2,1	
25	99-04-7	3-metüülbensoehape	2,4	pK_a = 4,27
26	106-48-9	4-klorofenool	2,4	pK_a = 9,1
27	79-01-6	Trikloroetüleen	2,4	
28	1912-24-9	Atrasiin	2,6	
29	93-89-0	Etüülbensoaat	2,6	

▼**M6**

	CASi number	Võrdlusaine	log P_{ow}	pK_a
30	1194-65-6	2,6-diklorobensonitriil	2,6	
31	535-80-8	3-klorobensoehape	2,7	pK_a = 3,82
32	108-88-3	Tolueen	2,7	
33	90-15-3	1-naftool	2,7	pK_a = 9,34
34	608-27-5	2,3-dikloroaniliin	2,8	
35	108-90-7	Klorobenseen	2,8	
36	1746-13-0	Allüülfenüüleeter	2,9	
37	108-86-1	Bromobenseen	3,0	
38	100-41-4	Etüülbenseen	3,2	
39	119-61-9	Bensofenoon	3,2	
40	92-69-3	4-fenüülfenool	3,2	pK_a = 9,54
41	89-83-8	Tümool	3,3	
42	106-46-7	1,4-diklorobenseen	3,4	
43	122-39-4	Difenüülamiin	3,4	pK_a = 0,79
44	91-20-3	Naftaleen	3,6	
45	93-99-2	Fenüülbensoaat	3,6	
46	98-82-8	Isopropüülbenseen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-triklorofenool	3,7	pK_a = 6
48	92-52-4	Bifenüül	4,0	
49	120-51-4	Bensüülbensoaat	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-*sec*-butüülfenool	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triklorobenseen	4,2	
52	143-07-7	Dodekaanhape	4,2	pK_a = 5,3
53	101-84-8	Difenüüleeter	4,2	
54	85-01-8	Fenantreen	4,5	
55	104-51-8	*n*-butüülbenseen	4,6	
56	103-29-7	Dibensüül	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenüülpüridiin	4,9	
58	206-44-0	Fluoranteen	5,1	
59	603-34-9	Trifenüülamiin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

MEETODI KIRJELDUS

Jaotuskoefitsiendi esialgne hindamine

16. Vajaduse korral võib uuritava aine jaotuskoefitsienti hinnata, kasutades soovitatavalt kas arvutusmeetodit (vt liide) või kui see on asjakohane, siis suhtarvu, mis iseloomustab aine lahustuvust puhastes lahustites.

Seadmed

17. Läheb vaja vähepulseeriva pumba ja sobiva tuvastamissüsteemiga vedelikukromatograafi. Paljude keemiliste rühmade tuvastamiseks sobib UV-detektor, mis töötab lainepikkusel 210 nm, või murdumisnäitaja detektor. Polaarsete rühmade esinemine liikumatus faasis võib HPLC-kolonni efektiivsust oluliselt vähendada. Seepärast peaks polaarsete rühmade sisaldus liikumatus faasis olema võimalikult väike (16). Võib kasutada müügilolevaid pöördfaasilisi mikrograanultäidiseid või valmiskolonne. Sisestamissüsteemi ja analüütilise kolonni vahele võib paigaldada kaitsekolonni.

Liikuv faas

18. Elueerimislahuse valmistamiseks kasutatakse HPLC jaoks piisava puhtusega metanooli ja destilleeritud või deioniseeritud vett ning enne kasutamist lahus degaseeritakse. Tuleks kasutada isokraatilist elueerimist. Metanooli ja vee suhe peaks olema selline, et lahuse veesisaldus on vähemalt 25 %. Tavaliselt piisab ainete puhul, mille log P on 6, elueerimisest ühe tunni jooksul voolukiirusel 1 ml/min seguga, milles metanooli ja vee ruumalasuhe on 3:1. Ainete puhul, mille log P on üle 6, võib olla vaja uuritava aine ja võrdlusainete elueerimisaega lühendada; selleks vähendatakse liikuva faasi polaarsust või kolonni pikkust.

19. Uuritav aine ja võrdlusained peavad olema liikuvas faasis piisaval määral lahustuvad, et võimaldada nende tuvastamist. Lisaaineid võib metanooli ja vee segus kasutada üksnes erandjuhul, kuna need muudavad kolonni omadusi. Sellisel juhul tuleb kontrollida, et lisaaine ei mõjuta uuritava aine ja võrdlusainete retentsiooniaega. Metanooli ja vee segu sobimatuse korral võib kasutada muid orgaanilise lahusti ja vee segusid, nt etanooli ja vee, atsetonitriili ja vee või isopropüülalkoholi (2-propanooli) ja vee segu.

20. Ioniseeritavate ainete puhul on oluline eluendi pH. See peaks jääma kolonni töövahemikku, mis on tavaliselt 2–8. Soovitatav on kasutada puhverlahust. Tuleks ära hoida soolade väljasadenemist ja kolonni omaduste halvenemist, mis võib juhtuda mõne orgaanilise lahusti ja puhverlahuse segu puhul. Ränidioksiidil põhineva liikumatu faasi kasutamisel ei ole soovitatav teha HPLC-analüüsi pH väärtustel üle 8, kuna leeliseline liikuv faas võib kolonni omadusi järsult halvendada.

Lahustatavad ained

21. Uuritav aine ja võrdlusained peavad olema piisavalt puhtad, et võimaldada igale ainele vastava piigi tuvastamist kromatogrammil. Võimaluse korral lahustatakse uuritavad ja kaliibrimiseks kasutatavad ained liikuvas faasis. Kui uuritava aine ja võrdlusainete lahustamiseks kasutatakse liikuva faasi lahusest erinevat lahustit, tuleks enne ainete süstimist kasutada lõpplahjenduse tegemiseks liikuva faasi lahust.

Katsetingimused

22. Temperatuur ei tohiks mõõtmiste käigus kõikuda rohkem kui ± 1 °C.

▼M6

Surnud aja t_0 määramine

23. Surnud aja t_0 mõõtmiseks võib kasutada kolonnis mittepeetuvaid orgaanilisi aineid (nt tiokarbamiid või formamiid). Täpsema surnud aja saamiseks võib määrata homoloogsete ainete (nt *n*-alküülmetüülketoonid) seeriasse kuuluva umbes seitsme aine retentsiooniaja (17). Koostatakse graafik retentsiooniaegade t_R (n_C + 1) ja t_R (n_C) vahelise sõltuvuse kohta; n_C tähistab süsinikuaatomite arvu. Saadakse sirge t_R (n_C + 1) = A × t_R (n_C) + (1 – A) × t_0, kus A väljendab suhet k(n_C + 1)/k(n_C) ja on konstantne. Surnud aeg t_0 leitakse algordinaadi (1 – A) × t_0 ja tõusu A väärtuste alusel.

Regressioonivõrrand

24. Järgmise sammuna koostatakse log k ja log P vahelist sõltuvust väljendav graafik sobivate võrdlusainete kohta, mille log P väärtused on sarnased uuritava aine eeldatava log P väärtusega. Praktikas süstitakse seadmesse üheaegselt kuus kuni kümme võrdlusainet. Määratakse retentsiooniajad, soovitatavalt meerikuga integraatori abil, mis on ühendatud tuvastamissüsteemiga. Vastavad mahtuvusteguri k logaritmitud väärtused esitatakse graafikul log P funktsioonina. Regressioonivõrrandit kontrollitakse korrapäraste ajavahemike järel, vähemalt kord päevas, et võtta arvesse võimalikke muutusi kolonni efektiivsuses.

UURITAVA AINE P_{OW} MÄÄRAMINE

25. Uuritav aine süstitakse seadmesse väikseimas tuvastatavas koguses. Retentsiooniaeg määratakse kahes korduses. Uuritava aine jaotuskoefitsient saadakse arvutatud mahtuvusteguri interpoleerimisel kaliibrimisgraafiku abil. Väga väikeste ja väga suurte jaotuskoefitsiendi väärtuste korral tuleb kasutada ekstrapoleerimist. Sel juhul tuleb pöörata erilist tähelepanu regressioonisirge usaldusvahemikule. Kui proovi retentsiooniaeg on võrdlusainete retentsiooniaegade vahemikust väljaspool, tuleks märkida asjaomane ülem- või alampiir.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Katseprotokoll

26. Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

— esialgse hindamise kohane jaotuskoefitsiendi väärtus, kui see on määratud, ning kasutatud meetod; arvutusmeetodi kasutamisel selle täielik kirjeldus, sealhulgas andmed kasutatud andmebaasi kohta ja üksikasjalik teave fragmentide valimise kohta;

— uuritava aine ja võrdlusainete puhtus, struktuurivalem ja CASi number;

— seadmete ja katsetingimuste kirjeldus: analüütiline kolonn, kaitsekolonn,

— liikuv faas, määramismeetod, temperatuurivahemik, pH;

— elueerimisprofiilid (kromatogrammid);

— surnud aeg ja selle määramise meetod;

— kaliibrimisel kasutatud võrdlusainete retentsiooniandmed ja nende log P_{ow} väärtused kirjanduse andmeil;

— andmed sobitatud regressioonisirge (log k *versus* log P_{ow}) ja vastava korrelatsioonikordaja kohta, sealhulgas usaldusvahemik;

▼**M6**

— uuritava aine keskmine retentsiooniaeg ja interpoleeritud log P_{ow} väärtus;

— segu puhul elueerimisprofiili kromatogramm, kus on märgitud piikide piirid;

— log P_{ow} väärtused võrrelduna neile vastavate piikide protsentuaalse pindalaga;

— regressioonisirge põhjal tehtud arvutused;

— vajaduse korral arvutatud kaalutud keskmine log P_{ow} väärtus.

KIRJANDUS

(1) Eadsforth, C. V., ja Moser, P. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere* 12: 1459.

(2) Klein, W. Kördel, W., Weiss, M., ja Poremski, H. J. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. *Chemosphere* 17: 361.

(3) Eadsforth, C. V. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. *Pestic. Sci*. 17: 311.

(4) Ellgehausen, H., D'Hondt, C., ja Fuerer, R. (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pestic. Sci*. 12: 219.

(5) McDuffie, B. (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Chemosphere* 10: 73.

(6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals – Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Juhendi kavand, november 2000.

(7) OSPAR (1995). „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995", 10. lisa. Merereostuse ärahoidmise Oslo ja Pariisi konventsioonide programmide ja meetmete komitee, Oviedo, 20.–24. veebruar 1995.

(8) Thatcher, M., Robinson, M., Henriquez, L. R., ja Karman, C. C. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Versioon 1.0, 3. august.

(9) Vik, E. A., Bakke, S., ja Bansal, K. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. *Environ. Model. Software* 13: 529–537.

(10) Renberg, L. O., Sundstroem, S. G., ja Sundh-Nygård, K. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. *Chemosphere* 9: 683.

(11) Hammers, W. E., Meurs, G. J., ja De-Ligny, C. L. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *J. Chrom*. 247: 1.

(12) Haky, J. E., ja Young, A. M. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *J. Liq. Chromat*. 7: 675.

(13) Fujisawa, S., ja Masuhara, E. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. *J. Biomed. Mater. Res*. 15: 787.

▼**M6**

(14) Hansch, C., ja Leo, A. J. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Wiley, New York.

(15) Hansch, C., esimees; Leo, A. J., dir. (1982). „Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity" – kättesaadav järgmisel aadressil: Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) Rekker, R. F., ja de Kort, H. M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. – *Chim. Ther*. 14: 479.

(17) Berendsen, G. E., Schoenmakers, P. J., de Galan, L., Vigh, G., Varga-Puchony, Z., ja Inczédy J. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromat*. 3: 1669.

▼M6

Liide

P_{OW} arvutamise meetodid

SISSEJUHATUS

1. Käesolevas liites tutvustatakse lühidalt P_{ow} arvutamist. Lisateave on kättesaadav käsiraamatutes (1, 2).

2. P_{ow} arvutatud väärtusi kasutatakse:

— katsemeetodi valimiseks: log P_{ow} väärtuste vahemiku –2 kuni 4 puhul loksutamismeetod ja log P_{ow} väärtuste vahemiku 0–6 puhul HPLC-meetod;

— HPLC kasutustingimuste (võrdlusained, metanooli ja vee suhe) valimiseks;

— katseliselt saadud väärtuste usaldusväärsuse kontrollimiseks;

— hinnangulise väärtusena, kui katsemeetodeid ei saa kasutada.

Arvutusmeetodite põhimõte

3. Allpool kirjeldatud arvutusmeetodid põhinevad molekuli teoreetilisel jagamisel sobivateks alaosadeks, mille kohta on teada usaldusväärsed log P_{ow} osaväärtused. Log P_{ow} saamiseks liidetakse alaosade log P_{ow} osaväärtused ja molekulisiseseid vastasmõjusid arvestavad parandustegurid. Alaosade konstandid ja parandustegurid on loetletud mitmes allikas (1, 2, 3, 4, 5, 6). Mõnda allikat ajakohastatakse korrapäraselt (3).

Arvutatud väärtuste usaldusväärsus

4. Üldjuhul on arvutusmeetodite usaldusväärsus seda väiksem, mida keerukam on uuritav aine. Väikese molekulmassiga lihtsate, ühe või kahe funktsionaalrühmaga molekulide puhul on eeldatav vahe erinevate osadeks jagamise meetodite abil leitud ja mõõdetud log P_{ow} väärtuste vahel 0,1–0,3 ühikut. Veamäär sõltub kasutatud alaosade konstantide usaldusväärsusest, oskusest võtta arvesse molekulisiseseid vastasmõjusid (nt vesiniksidemed) ja parandustegurite õigest kasutamisest. Ioniseeruvate ainete puhul tuleb arvesse võtta laengut ja ioniseerituse ulatust (10).

Fujita-Hanschi π-meetod

5. Hüdrofoobse asendaja konstant π, mille algselt võtsid kasutusele Fujita *et al.* (7), on määratletud järgmiselt:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH),$$

kus PhX aromaatne derivaat on ja PhH on lähteaine.

Nt: $^{\pi}Cl = \log P_{ow}\ (C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\ (C_6H_6)$
$= 2{,}84 - 2{,}13$
$= 0{,}71$

π-meetodit kasutatakse eelkõige aromaatsete ainete puhul. π väärtused on kättesaadavad paljude asendajate kohta (4, 5).

Rekkeri meetod

6. Rekkeri meetodi (8) kohaselt arvutatakse log P_{ow} väärtus järgmiselt:

$$log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{vastasmõjutegurid}),$$

▼M6

kus a_i on arv, mis näitab, mitu korda konkreetne alaosa molekulis esineb, ja f_i on selle alaosa log P_{ow} osaväärtus. Vastasmõjutegurid on summaarselt väljendatavad konstandi C_m (nn maagiline konstant) kordsena. Alaosade konstandid f_i ja konstant C_m on määratud 825 aine 1 054 katseliselt saadud P_{ow} väärtuse põhjal, kasutades mitme muutujaga regressioonanalüüsi (6, 8). Vastasmõjutegurite määramine toimub kindlate eeskirjade kohaselt (6, 8, 9).

Hanschi-Leo meetod

7. Hanschi-Leo meetodi (4) kohaselt arvutatakse log P_{ow} väärtus järgmiselt:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j,$$

kus f_i on alaosa konstant, F_j on parandustegur ning a_i ja b_j on vastavad esinemissagedused. Aatomite ja funktsionaalrühmade konstantide ja parandustegurite F_j loetelud on koostatud katse-eksituse meetodil katseliselt saadud P_{ow} väärtuste alusel. Parandustegurid on jagatud mitmesse eri klassi (1, 4). Kõikide eeskirjade ja parandustegurite arvessevõtmiseks on välja töötatud tarkvarapaketid (3).

KOMBINEERITUD MEETOD

8. Keerukate molekulide log P_{ow} arvutamise täpsust on võimalik oluliselt suurendada, kui molekul jagatakse suurematekseks alaosadeks, mille kohta on olemas tabelites esitatud (3, 4) või mõõtmiste teel saadud usaldusväärsed log P_{ow} väärtused. Selliste alaosade (nt heterotsüklid, antrakinoon, asobenseen) osaväärtused saab seejärel kombineerida Hanschi π väärtustega või Rekkeri või Leo meetodi puhul kasutatavate alaosa konstantidega.

Märkused

i) Need arvutusmeetodid on osaliselt või täielikult ioniseeritud ainete puhul kasutatavad üksnes juhul, kui võetakse arvesse vajalikke parandustegureid.

ii) Kui võib eeldada molekulisiseste vesiniksidemete olemasolu, tuleb lisada vastavad parandustegurid (umbes + 0,6 kuni + 1,0 log P_{ow} ühikut) (1). Viiteid selliste sidemete olemasolule saab stereomudelitest ja spektroskoopiaandmetest.

iii) Mitme tautomeerse vormi võimaliku esinemise korral lähtutakse arvutustes kõige tõenäolisemast vormist.

iv) Tuleks hoolikalt jälgida alaosade konstantide loeteludes tehtavaid muudatusi.

ARVUTUSMEETODEID KÄSITLEV KIRJANDUS

(1) Lyman, W. J., Reehl, W. F., ja Rosenblatt, D. H. (toim.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. McGraw-Hill, New York (1982).

(2) Lyman, W. J., Block, J. H., ja Pearlman, R. S. (toim.). Partition Coefficient, Determination and Estimation. Pergamon Press, Elmsford (New York) ja Oxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA. Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(4) Hansch, C., ja Leo, A. J. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Wiley, New York (1979).

▼**M6**

(5) Leo, A., Hansch, C., ja Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev*. 71: 525.

(6) Rekker, R. F., ja de Kort, H. M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. – *Chim. Ther*. 14: 479.

(7) Fujita, T., Iwasa, J., ja Hansch, C. (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients *J. Amer. Chem. Soc*. 86: 5175.

(8) Rekker, R. F. The Hydrophobic Fragmental Constant. Pharmacochemistry Library, 1. köide, Elsevier, New York (1977).

(9) Eadsforth, C. V., ja Moser, P. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere* 12: 1459.

(10) Scherrer, R. A. ACS – Symposium Series 255, lk 225. American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼M7

A.25. DISSOTSIATSIOONIKONSTANDID VEES (TIITRIMISMEETOD, SPEKTROFOTOMEETRILINE MEETOD, KONDUKTOMEETRILINE MEETOD)

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 112 (1981).

Eeltingimused

— Sobiv analüüsimeetod

— Lahustuvus vees

Juhendteave

— Struktuurivalem

— Konduktomeetrilise meetodi puhul elektrijuhtivus

Erinõuded

— Kõigi katsemeetodite puhul tuleb kasutada puhtaid või kaubandusliku puhtusklassiga aineid. Tuleb kaaluda, millist mõju võivad tulemustele avaldada lisandid.

— Tiitrimismeetod ei sobi vähelahustuva uuritava aine puhul (vt allpool, katselahused).

— Spektrofotomeetriline meetod on kohaldatav ainult juhul, kui aine dissotsieerunud ja dissotsieerumata vormi UV või nähtava valguse neeldumisspektrid on oluliselt erinevad. See meetod võib samuti sobida vähese lahustuvusega ainete ja muu kui happe-aluse dissotsiatsiooni, st kompleksimoodustumise puhul.

— Kui Onsageri võrrand kehtib, võib konduktomeetrilist meetodit kasutada isegi mõõdukalt väikse kontsentratsioon ja isegi muu kui happe-aluse tasakaalu puhul.

Alusdokumendid

Käesolev katsemeetod põhineb meetoditel, mis on esitatud osas „Kirjandus“ loetletud dokumentides, samuti 18. augusti 1978. a EPA tootmiseelse teatise suuniste esialgsel kavandil (*Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA*).

MEETOD: SISSEJUHATUS, EESMÄRK, KASUTUSALA, ASJAKOHASUS, KASUTAMINE JA KATSEMEETODI PIIRANGUD

Aine keskkonnamõju hindamisel on oluline teada tema dissotsieerumist vees. Dissotsieerumisest oleneb, millisel kujul aine esineb; see omakorda määrab aine käitumise ja edasikandumise. See võib mõjutada kemikaali adsorptsiooni pinnasel ja setetes, samuti neeldumist rakkudes.

Mõisted ja mõõtühikud

Dissotsieerumine on pöörduv jagunemine kaheks või enamaks keemiliseks üksuseks, mis võivad olla ioonsed. Seda protsessi kirjeldatakse üldiselt võrrandiga

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

ning kontsentratsioonide kaudu väljendatud reaktsiooni tasakaaluolekut kirjeldab tasakaalukonstant

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Näiteks erijuhul, kui R on vesinik (aine on hape), kirjeldab konstanti võrrand

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

või

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Võrdlusained

Järgmisi võrdlusaineid ei ole uue aine uurimisel alati vaja kasutada. Need on esitatud peamiselt selleks, et kaliibrida aeg-ajalt meetodit ja võimaldada tulemuste võrdlemist muu meetodi abil saadud tulemusega.

	pK_a (1)	Temperatuur, °C
p-nitrofenool	7,15	25 (1)
Bensoehape	4,12	20
p-kloroaniliin	3,93	20

(1) Väärtus 20 °C juures ei ole teada, kuid võib eeldada, et mõõtmistulemuste varieeruvus on suurem kui eeldatav temperatuurisõltuvus.

Kasulik oleks kasutada ainet, millel on mitu pK-d, nagu on näidatud allpool meetodi põhimõtte selgitamisel. Selline aine saaks olla:

sidrunhape	pK_a (8)	Temperatuur, °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Katsemeetodi põhimõte

Kirjeldatav keemiline protsess sõltub keskkonnatemperatuurile vastavas vahemikus üldiselt vaid vähe temperatuurist. Dissotsiatsioonikonstandi määramiseks on vaja mõõta kemikaali dissotsieerunud ja dissotsieerumata vormi kontsentratsioonid. Teades eespool mõistete ja mõõtühikute osas kirjeldatud stöhhiomeetriat, saab määrata asjakohase konstandi. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud erijuhtumi korral käitub aine happe või alusena ja määramist on kõige parem teha aine ioniseeritud ja ioniseerimata vormi suhteliste kontsentratsioonide ja lahuse pH määramisega. Nende terminite vaheline seos on esitatud pK_a valemiga, vt eespool osa „Mõisted ja mõõtühikud“. Mõnel ainel on rohkem kui üks dissotsiatsioonikonstant ja nende jaoks saab tuletada sarnased valemid. Mõned kirjeldatud meetoditest sobivad kasutamiseks ka muu kui happe-aluse dissotsiatsiooni puhul.

Kvaliteedinõuded

Korduvus

Dissotsiatsioonikonstandi väärtused (vähemalt kolmest paralleelmääramisest) peavad olema vahemikus ± 0,1 logaritmilist ühikut.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

pK_a määramisele on kaks peamist lähenemisviisi. Ühe meetodi puhul tiitritakse aine teadaolevat kogust vastavalt vajadusele happe või aluse standardlahusega; teise meetodi puhul määratakse ioniseeritud ja ioniseerimata vormide suhteline kontsentratsioon ja selle pH-sõltuvus.

▼M7

Ettevalmistused

Neile põhimõtetele tuginevad meetodid võib jaotada tiitrimiseks, spektrofotomeetriliseks ja konduktomeetriliseks määramiseks.

Katselahused

Tiitrimismeetodi ja konduktomeetrilise meetodi kasutamiseks tuleb kemikaal lahustada destilleeritud vees. Spektrofotomeetrilise meetodi ja muude meetodite puhul kasutatakse puhverlahuseid. Uuritava aine kontsentratsioon ei tohi ületada väiksemat järgmistest – 0,01 M või pool küllastuskontsentratsiooni – ning lahuste valmistamiseks tuleks kasutada aine kõige puhtamat kättesaadavat vormi. Kui aine on vees halvasti lahustuv, võib selle lahustada väheses koguses veega segunevas lahustis enne eespool osutatud kontsentratsioonide saavutamiseks vajaliku koguse lisamist.

Lahuseid tuleb kontrollida emulsiooni esinemise suhtes; selleks kasutatakse Tyndalli efekti; see on eriti oluline siis, kui lahustuvuse suurendamiseks lisati kaaslahustit. Puhverlahuse kasutamise korral ei tohi puhvri kontsentratsioon ületada 0,05 M.

Katsetingimused

Temperatuur

Temperatuuri tuleb reguleerida täpsusega vähemalt ± 1 °C. Mõõtmised tuleks eelistatult teha 20 °C juures.

Kui kahtlustatakse tugevat sõltuvust temperatuurist, tuleb määramised teha veel vähemalt kahel temperatuuril. Sellisel juhul peaksid temperatuuri intervallid olema 10 °C ja temperatuuri reguleerimise täpsus ± 0,1 °C.

Analüüsid

Meetodi valimine sõltub uuritava aine omadustest. Meetod peab olema piisavalt tundlik, et võimaldada aine eri vormide määramist igal uuritava lahuse kontsentratsioonil.

Katse käik

Tiitrimismeetod

Uuritavat lahust tiitritakse, vastavalt vajadusele kas aluse või happe standardlahusega, ning pH määratakse pärast iga titrandikoguse lisamist. Enne ekvivalentsuspunkti saavutamist tuleb lisada vähemalt 10 titrandikogust. Kui tasakaal saavutatakse piisavalt kiiresti, võib kasutada registreerivat potentsiomeetrit. Selle meetodi puhul peavad nii aine üldkogus kui ka kontsentratsioon olema täpselt teada. Tuleb kasutada ettevaatusabinõusid, et välistada süsinikdioksiidi juurdepääs. Katse läbiviimise üksikasjad, ettevaatusabinõud ja arvutused on esitatud standardkatsete kirjeldustes (vt näiteks viited 1–4).

Spektrofotomeetriline meetod

Määratakse lainepikkus, mille juures ioniseeritud ja ioniseerimata vormi ekstinktsioonikoefitsiendid on märgatavalt erinevad. Määratakse muutumatu kontsentratsiooniga lahuste UV- või nähtava valguse neeldumisspekter pH eri väärtustel, millel aine on peamiselt ioniseerimata, on täielikult ioniseeritud, ning veel mitmel vahepealsel pH väärtusel. Seda võib teha kas kontsentreeritud happe (aluse) väikeste ruumalaliste koguste lisamisega uuritava aine lahuse suhteliselt suurele ruumalalisele kogusele paljukomponendilises puhvris, mis on algul väikese (suure) pH-ga (viide 5), või uuritava aine põhilahuse (nt vees, metanoolis) võrdses ruumalas lisamisega muutumatu ruumalaga eri puhverlahustele, mille pH väärtused katavad kogu soovitud pH-vahemiku. pH väärtustest ja neeldumise väärtustest valitud lainepikkusel arvutatakse piisav arv pK_a väärtusi, kasutades andmeid, mis on saadud vähemalt viiel pH väärtusel, millel aine on vähemalt 10 % ja vähem kui 90 % ioniseeritud. Katse täiendavad üksikasjad ja arvutamismeetod on esitatud viites 1.

▼M7

Konduktomeetriline meetod

Kasutades väikese ja teadaoleva konstandiga juhtivusandurit, mõõdetakse konduktomeetriaks sobivas vees lahustatud uuritava aine ligikaudu 0,1 M lahuse juhtivus. Mõõdetakse ka rea sellest lahusest täpselt valmistatud lahjenduste juhtivuse väärtused. Iga lahjendusega vähendatakse kontsentratsiooni poole võrra ja seeria peaks hõlmama vähemalt üht kontsentratsiooni suurusjärku. Määratakse ka juhtivuse piirväärtus lõpmatul lahjendusel; selleks tehakse samasugune katse naatriumisoolaga ja ekstrapoleeritakse. Seejärel võib iga lahuse juhtivusest arvutada Onsageri võrrandi abil dissotsiatsiooniastme ja selle alusel arvutada Ostwaldi lahjendusseaduse abil dissotsiatsioonikonstandi $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, kus C on molaarne kontsentratsioon (mol/l) ja α on aine dissotsieerunud fraktsioon. Tuleb kasutada ettevaatusabinõusid, et välistada CO_2 juurdepääs. Täiendavad katse üksikasjad ja arvutamismeetod on esitatud alustekstides ning viidetes 1, 6 ja 7.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

Tiitrimismeetod

pK_a arvutatakse tiitrimiskõvera 10 mõõdetud punkti järgi. Arvutatakse selliste pK_a-de keskväärtus ja standardhälve. Andmed esitatakse tabelina ja koostatakse graafik pH sõltuvuse kohta aluse või happe standardlahuse lisatud ruumalast.

Spektrofotomeetrilised meetodid

Iga spektri kohta esitatakse tabelis neelduvus ja pH. Arvutatakse vähemalt viis väärtust pK_a jaoks vahepealsetest spektriandmepunktidest; nendest väärtustest arvutatakse veel keskväärtus ja standardhälve.

Konduktomeetriline meetod

Arvutatakse ekvivalentjuhtivus Λ happe iga kontsentratsiooni jaoks ja sellise segu iga kontsentratsiooni jaoks, mille saamiseks segatakse üks ekvivalent hapet ja 0,98 ekvivalenti karbonaadivaba naatriumhüdroksiidi. Hape on liias, et vältida hüdrolüüsi tõttu tekkivat OH^- liiga. Tehakse graafik teljestikus $1/\Lambda$ ja Ö_C ning soola Λ_o saab sellest leida ekstrapoleerimisega kontsentratsioonile 0.

Happe Λ_o saab arvutada kirjanduses esitatud H^+ and Na^+ väärtustest. pK_a saab arvutada tulemustest $\alpha = \Lambda_i/\Lambda_o$ ja iga kontsentratsiooni $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$. K_a täpsemad väärtused saadakse siis, kui viiakse sisse ka liikuvust ja aktiivsust arvestavad parandid. Tuleb arvutada ka pK_a väärtuste keskväärtus ja standardhälve.

Katseprotokoll

Kõik saadud töötlemata andmed ja arvutatud pK_a väärtused tuleb esitada koos arvutamismeetodiga eelistatult tabelina, nagu on soovitatud viites 1, samuti tuleb esitada eespool kirjeldatud statistilised parameetrid. Tiitrimismeetodite puhul tuleb esitada titrantide standardimise üksikasjad.

Spektrofotomeetrilise meetodi puhul tuleb esitada kõik spektrid. Konduktomeetrilise meetodi puhul tuleb esitada konduktomeetri konstandi määramise üksikasjalik kirjeldus. Esitada tuleb ka kasutatud meetodit, analüüsimeetodeid ja kõiki kasutatud puhvreid käsitlev teave.

Tuleb esitada katse temperatuur(id).

KIRJANDUS

(1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

(5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (vt eespool (4)).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

B OSA: MÜRGISUSE JA MUUDE TERVISEMÕJUDE MÄÄRAMISE MEETODID

SISUKORD

ÜLDINE SISSEJUHATUS

B.1a. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – KINDLA ANNUSE PROTSEDUUR

B.1b. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – ÄGEDA MÜRGISUSASTME MEETOD

B.2. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL

B.3. ÄGE MÜRGISUS (NAHAKAUDNE)

B.4. ÄGE NAHAÄRRITUS/-SÖÖVITUS

B.5. SILMADE ÄGE ÄRRITUS/SÖÖVITUS

B.6. NAHA SENSIBILISEERIMINE

B.7. SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 28-PÄEVANE UURING NÄRILISTEL

B.8. SUBAKUUTNE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 28-PÄEVANE UURING

B.9. KORDUSDOOSI MÜRGISUS (28 PÄEVA, NAHAKAUDNE)

B.10. *IN VITRO* KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJARAKKUDEGA

B.11. KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJATE LUUÜDIGA

B.12. MIKROTUUMADE TEKKE KATSE IMETAJATE ERÜTROTSÜÜTIDEGA

B.13/14. MUTAGEENSUS – BAKTERITE PÖÖRDMUTATSIOONKATSE

B.17. HPRT VÕI XPRT GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO* GEENIMUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA

B.21. IMETAJARAKU TRANSFORMATSIOONITESTID *IN VITRO*

B.22. DOMINANTSE LETAALSE MÕJU KATSE NÄRILISTEGA

▼B

B.23. KROMOSOOMIABERRATSIOONIKATSE IMETAJATE SPERMATOGOONIDEGA

B.25. HIIRE PÄRILIK TRANSLOKATSIOON

B.26. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE – SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE UURING NÄRILISTEL

B.27. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE – SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE UURING MITTENÄRILISTEL

B.28. SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST NAHAKAUDSEL MANUSTAMISEL 90PÄEVANE KORDUVANNUSTE NAHAKAUDSE MANUSTAMISE UURING NÄRILISTE LIIKIDEL

B.29. SUBKROONILINE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 90-PÄEVANE UURING

B.30. KROONILISE MÜRGISUSE UURINGUD

B.31. SÜNNIEELSE ARENGU MÜRGISUSE UURIMUS

B.32. KANTSEROGEENSUSE UURINGUD

B.33. KOMBINEERITUD KROONILISE TOKSILISUSE – KANTSEROGEENSUSE UURING

B.34. ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONITOKSILISUSE UURING

B.35. KAHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONI TOKSILISUSE UURING

B.36. TOKSIKOKINEETIKA

B.37. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUS PÄRAST ÄGEDAT KOKKUPUUTUMIST

B.38. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUSE 28PÄEVANE KORDUSDOOSI UURING

B.39. PLAANIVÄLISE DNA SÜNTEESI (UDS) KATSE IMETAJATE MAKSARAKKUDEGA *IN VIVO*

B.40. *IN VITRO* NAHASÖÖVITUS: TRANSKUTAANSE ELEKTRITAKISTUSE (TET) MÕÕTMISEL PÕHINEV KATSEMEETOD

B.40b. *IN VITRO* NAHASÖÖVITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD

B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOKSILISUSE KATSE

B.42. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÕLMEDE KATSE

▼B

B.43. NEUROTOKSILISUSE UURING NÄRILISTEL

B.44. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VIVO* MEETOD

B.45. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VITRO* MEETOD

B.46. *IN VITRO* NAHAÄRRITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD

B.47. VEISE SARVKESTA HÄGUSUSE JA LÄBILASKVUSE KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEOSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

B.48. ISOLEERITUD KANASILMA KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEOSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

B.49. MIKROTUUMADE TEKKE *IN VITRO* KATSE IMETAJARAKKUDEGA

B.50. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÕLMEDE KATSE: DA

B.51. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÕLMEDE KATSE: BRDU-ELISA

B.52. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL – ÄGEDA MÜRGISUSE KLASSI MÄÄRAMISE MEETOD

B.53. ARENGUHÄIREID PÕHJUSTAVA NEUROTOKSILISUSE UURING

B.54. UTEROTROOFNE BIOKATSE NÄRILISTEL: KIIRE SÕELKATSE ÖSTROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS

B.55. HERSHBERGERI BIOKATSE ROTTIDEL: KIIRE SÕELKATSE (ANTI)ANDROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS

B.56. LAIENDATUD ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTIIVTOKSILISUSE UURING

B.57. H295R STEROIDOGENEESI KATSE

B.58. TRANSGEENSE NÄRILISE SOMAATILISTE JA SUGURAKKUDE GEENIDE MUTATSIOONI KATSE

B.59. NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN CHEMICO*: OTSENE REAKTSIOONIVÕIME KATSE PEPTIIDIDEGA (*DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY*, DPRA)

B.60. NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN VITRO*: ARE-NRF2 LUTSIFERAASI KATSEMEETOD

B.61. FLUORESTSEIINI LEKKE KATSEMEETOD SILMI SÖÖVITAVATE JA TUGEVALT ÄRRITAVATE KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS

B.62. LEELISELINE *IN VIVO* KOMEEDIKATSE IMETAJARAKKUDEGA

▼B

B.63. REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURING

B.64. REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURINGUT HÕLMAV KORDUVANNUSTAMISEL PÕHINEV MÜRGISUSUURING

B.65. *IN VITRO* MEMBRAANIBARJÄÄRI KATSEMEETOD NAHASÖÖVITUSE UURIMISEKS

B.66. STABIILSE TRANSFEKTSIOONIGA TRANSAKTIVATSIOONI *IN VITRO* KATSEMEETODID, MILLEGA AVASTATAKSE ÖSTROGEENIRETSEPTORITE AGONISTE JA ANTAGONISTE

B.67. TÜMIDIINI KINAASI GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO* GEENIMUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA

B.68. LÜHIAJALISE KOKKUPUUTE IN VITRO KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEOSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

B.69. REKONSTRUEERITUD INIMESE SARVKESTA SARNASE EPITEELI (RhCE) KATSEMEETOD NENDE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA EGA MÄRGISTADA SEOSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

B.70. REKOMBINANTSEL INIMESE ÖSTROGEENIRETSEPTORIL (hrER) PÕHINEVAD *IN VITRO* ANALÜÜSIMEETODID ÖSTROGEENIRETSEPTORIGA SEONDUVATE KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS

B.71. NAHA SENSIBILISEERIMISE *IN VITRO* KATSED, MILLEGA UURITAKSE DENDRIITRAKKUDE AKTIVEERIMISEGA SEOTUD OLULIST ETAPPI NAHA SENSIBILISEERIMISES SEISNEVA KAHJULIKU TOIME RAJAS

▼B

ÜLDINE SISSEJUHATUS

A. **UURITAVA AINE ISELOOMUSTUS**

Uuritava aine koostis, sealhulgas peamised lisandid ja selle vastavad füüsikalis-keemilised omadused (sealhulgas stabiilsus), peaksid olema teada enne toksilisuse uuringu alustamist.

Uuritava aine füüsikalis-keemilised omadused annavad olulist teavet manustamisviisi valimise, iga konkreetse uuringu kavandamise ning uuritava aine käitlemise ja säilitamise jaoks.

Doseeritavas aines ja bioloogilises materjalis oleva uuritava aine (sealhulgas võimaluse korral peamiste lisandite) kindlakstegemiseks kasutatav kvalitatiivne ja kvantitatiivne analüüsimeetod tuleks välja töötada enne uuringu alustamist.

Katsearuanne peaks hõlmama kogu teavet uuritava aine identifitseerimise, selle füüsikalis-keemiliste omaduste, selle puhtuse ja käitumise kohta.

B. **LOOMADE HOOLDAMINE**

Toksilisuse uurimisel on oluline keskkonnatingimuste range kontroll ja õiged loomade hooldamise viisid.

i) *Pidamistingimused*

Katsealuste loomade ruumide või piirdeaedade keskkonnatingimused peaksid olema katseliikide jaoks sobivad. Rottide, hiirte ja merisigade puhul on sobiv toatemperatuur 22 ± 3 °C ning suhteline õhuniiskus peaks olema 30–70 %; küülikute puhul peaks temperatuur olema 20 ± 3 °C ning suhteline õhuniiskus 30–70 %.

Mõned uurimismeetodid on temperatuuri suhtes eriti tundlikud ning sellistel puhkudel on sobivate temperatuuritingimuste üksikasjad lisatud uurimismeetodi kirjeldusse. Kõikide toksilise toime uuringute puhul tuleks jälgida temperatuuri ja niiskust, samuti tuleks need andmed registreerida ning uuringu lõpparuandesse lisada.

Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valget ja 12 tundi pimedat aega. Valgustustsükli üksikasjad tuleks registreerida ja märkida uuringu lõpparuandesse.

Kui meetodis ei ole teisiti sätestatud, võib loomi pidada üksikult või väikeste rühmadena, kus emas- ja isasloomad on eraldi; kui puuris on mitu looma, ei tohiks koos olla rohkem kui viis looma.

Loomkatsete aruannetes on oluline ära märkida, millist tüüpi puure kasutati ning mitu looma igas puuris nii keemilise ainega kokkupuutumise kui ka järgneva vaatlusperioodi jooksul oli.

▼B

ii) *Söötmistingimused*

Toiduvalik peaks vastama kõikidele katses kasutatava liigi toitainevajadustele. Kui uuritavat ainet manustatakse loomadele toidu kaudu, võib toidu toiteväärtust vähendada vastava uuritava aine ja toidukomponendi võrra. Sellise reaktsiooni võimalikkust tuleks katse tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta. Kasutada võib ka tavapärast katseloomadele mõeldud toitu ning joogivee hulk peab olema piiramatu. Toidu valikut võib mõjutada vajadus tagada sobiv segu, mis võimaldab uuritava aine manustamist koos toiduga.

Toksilisust mõjutavaid toidu saasteaineid ei tohiks olla sellises kontsentratsioonis, et see segaks katse tegemist.

C. **ALTERNATIIVSED KATSED**

Euroopa Liit püüab edendada alternatiivmeetodite väljatöötamist ja kinnitamist, mis annaksid loomkatsetest saadud teabega tasemelt samaväärset teavet, kuid kus kasutataks vähem loomi ja mis põhjustaksid vähem kannatusi või milles välditakse üldse loomade kasutamist.

Selliste meetodite olemasolu korral tuleb neid kasutada igal võimalusel ohu kirjeldamisel ja seejärel loomuomase ohtlikkuse liigitamisel ja märgistamisel.

D. **HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Katsete hindamisel ja tõlgendamisel tuleb arvesse võtta seda, millisel määral on loomkatsete ja *in vitro* uuringute tulemusi võimalik ekstrapoleerida vahetult inimesele, ning seetõttu võib võimaluse korral kasutada katse tulemuste kinnitamiseks tõendeid kahjulikust toimest inimese tervisele.

E. **VIITED KIRJANDUSELE**

Enamik nendest meetoditest on töötatud välja OECD programmi „Testing Guidelines” raames ning neid tuleks kasutada kooskõlas heade laboritavadega, et tagada võimalikult laialdane „andmete vastastikune heakskiitmine”.

Lisateavet võib leida OECD suunistes olevatest viidetest ja muust asjakohasest kirjandusest.

▼B

B.1 a. **ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – KINDLA ANNUSE PROTSEDUUR**

1. **MEETOD**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD TG 420ga (2001).

1.1. SISSEJUHATUS

Traditsioonilised ägeda mürgisuse hindamise meetodid kasutavad loomade surma lõpetamiskriteeriumina. 1984. aastal soovitas British Toxicology Society uut lähenemist ägeda mürgisuse katsetamisele, mis põhineb aine manustamisel kindla annusemääraga seeriana (1). See lähenemine vältis loomade surma kasutamist lõpetamiskriteeriumina ja tugines selle asemel selgete mürgisuse nähtude vaatlemisele ühel seeriast valitud kindlal annusemääral. Protseduur kiideti katsemeetodina heaks 1992. aastal Ühendkuningriigi (2) ja rahvusvaheliste (3) *in vivo* valideerimiste põhjal. Seejärel hinnati kindla annuse protseduuri statistilisi omadusi matemaatiliste mudelite abil mitmetes uuringutes (4, 5, 6). *In vivo* ja mudeluuringud on tõestanud, et protseduur on korratav, et selles kasutatakse vähe loomi ja et see põhjustab vähem kannatusi kui traditsioonilised meetodid ning et selle abil saab klassifitseerida ained nii nagu muude ägeda mürgisuse katsemeetoditega.

Juhised antud eesmärgi saavutamiseks kõige sobivama katsemeetodi valimiseks võib leida ägeda suukaudse mürgisuse katsete juhisdokumendist („Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing” (7)). Nimetatud juhisdokument sisaldab samuti lisateavet katsemeetodi B.1a kasutamise ja tõlgendamise kohta.

Meetodi põhimõte on, et põhiuuringus kasutatakse üksnes mõõdukalt mürgiseid annuseid ja et tõenäoliselt surmavate annuste manustamist tuleks vältida. Samuti ei tohiks manustada annuseid, mis teatavasti põhjustavad märkimisväärset valu või kannatusi sööbivate või tõsiselt ärritavate mõjude tõttu. Suremas loomad või loomad, kes ilmselt on valus või kellel on tugeva ja kestva kannatuse tunnused, surmatakse humaanselt ning need võetakse arvesse katsetulemuste tõlgendamisel samamoodi nagu loomi, kes surid katse käigus. Eraldi juhisdokumendis (8) on esitatud kriteeriumid, mille põhjal tehakse otsus suremas või raskelt kannatavate loomade surmamiseks, ja juhised prognoositava või ähvardava surma kindlakstegemiseks.

Meetod annab teavet ohtlike omaduste kohta ning võimaldab reastada ja klassifitseerida ainet ägedat mürgisust põhjustavate kemikaalide klassifitseerimiseks vastavalt globaalselt harmoneeritud süsteemile (Globally Harmonised System – GHS (9)).

Katselaboratoorium võtab arvesse kogu katseaine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave sisaldab aine nimetust ja keemilist struktuuri, selle füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainega *in vitro* või *in vivo* tehtud mürgisuskatsete tulemusi, struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid ja aine eeldatavat otstarvet. Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks, ja aitab valida sobivat lähteannust.

▼B

1.2. MÕISTED

Äge suukaudne mürgisus – viitab sellistele kahjulikele mõjudele, mis ilmnevad pärast aine suukaudselt manustamist ühekordse annuse või seeriaviisiliste annustena 24 tunni jooksul.

Edasilükkunud surm – loom ei sure ega näi olevat suremas 48 tunni jooksul, kuid sureb hiljem, 14päevase jälgimisperioodi jooksul.

Annus – manustatava katseaine kogus. Annust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (nt mg/kg).

Ilmne mürgisus – üldine mõiste, mis kirjeldab katseaine manustamise järel ilmnenud selgeid mürgisuse tunnuseid (vt näiteid viitest 3). Suuruselt järgmine kindel annus võib põhjustada enamikul loomadest tõenäoliselt kas tugevat valu ja kestva tugeva kannatuse tunnuseid, surmaeelset seisundit (kriteeriumid on toodud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)) või tõenäoliselt surma.

GHS – Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (keemiliste ainete ja segude globaalselt harmoneeritud klassifitseerimissüsteem). Ühistegevus, milles osalevad OECD (inimeste tervis ja keskkond), ohtlike ainete vedu käsitlev ÜRO eksperdikomitee (füüsikalis-keemilised omadused) ja ILO (ohtudest teavitamine) ning mida koordineerib kemikaalide mõistlikku haldamist käsitlev organisatsioonidevaheline programm (IOMC).

Ähvardav surm – loom on suremas või sureb tõenäoliselt enne järgmist kavandatud jälgimisperioodi. Närilistel võiksid sellisele seisundile viitavateks märkideks olla krambid, külili magamine, loidus ja värin (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)).

LD_{50} (surmava annuse mediaan) – aine statistiliselt määratletud ühekordne annus, mis tõenäoliselt põhjustab suukaudsel manustamisel surma 50 %-l loomadest. LD_{50} väärtust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (mg/kg).

Piirannus – vastab katses kasutatavale maksimaalsele annusele (2 000 või 5 000 mg/kg).

Surmaeelne seisund – loomad, kes on suremas või kes ei suuda ellu jääda ravist hoolimata (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)).

Ennustatav surm – selliste kliiniliste tunnuste olemasolu, mis viitavad sellele, et surm saabub teatud aja möödumisel enne katse kavandatavat lõppu, näiteks suutmatus tarbida vett või toitu (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)).

▼B

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ühesooliste loomade rühmadele annustatakse katseainet järk-järgult 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg kindlate annustena (erandkorras võidakse kasutada 5 000 mg/kg kindlat lisaannust, vt punkti 1.6.2). Esialgne annusemäär valitakse eelkatse põhjal annusena, mis eeldatavasti põhjustab mõningaid mürgisuse nähte, kuid ei põhjusta tõsiseid toksilisi mõjusid või suremust. Valu, kannatuse ja ähvardava surmaga seotud kliinilisi tunnuseid ja tingimusi kirjeldatakse üksikasjalikult OECD juhisdokumendis (8). Järgnevatele loomarühmadele võib annustada kaitseaine suuremaid või väiksemaid kindlaid annuseid sõltuvalt sellest, kas neil on olemas või puuduvad märgid mürgisuse või suremuse kohta. Käesolevat protseduuri jätkatakse seni, kuni on kindlaks tehtud tõenäoliselt mürgisust põhjustav annus või surmajuhtum, või kui suurim annus ei avalda mõju või kui väikseim annus põhjustab surma.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Loomaliikide valik**

Eelistatud näriliste liik on rotid, kuigi võib kasutada ka näriliste teisi liike. Tavaliselt kasutatakse emasloomi (7). Selle põhjuseks on, et tavapäraseid LD_{50} katseid käsitlevad kirjandusülevaated näitavad, et sugupoolte tundlikkuses on vähe erinevusi, kuid neil juhtudel, kui erinevusi on täheldatud, on emasloomad üldiselt veidi tundlikumad (10). Kui struktuurselt samalaadsete kemikaalide toksikoloogilisi või toksikokineetilisi omadusi käsitlevatest andmetest nähtub, et isasloomad on tõenäoliselt tundlikumad, siis kasutatakse neid. Kui katse sooritatakse isasloomadega, tuleks esitada piisav põhjendus.

Kasutatakse noorte tervete täiskasvanud loomade enim kasutatavaid laboritüvesid. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Iga loom peaks annustamise alustamisel olema 8–12 nädalat vana ning tema mass ei tohiks erineda rohkem kui ± 20 % varem annuse saanud loomade keskmisest massist.

1.4.2. **Loomade pidamise ja toitmise tingimused**

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal, peaks eesmärk olema hoida seda vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatu hulga joogiveega. Loomad võib grupeerida puuridesse annuse põhjal, kuid puuris olevate loomade arv ei tohiks takistada iga looma selget jälgimist.

1.4.3. **Loomade ettevalmistamine**

Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks ning hoitakse oma puurides vähemalt 5 päeva enne annustamise alustamist, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega.

▼B

1.4.4. **Annuste valmistamine**

Üldiselt manustatakse katseaineid kasutatavate annuste vahemikus konstantses mahus nii, et muutub annustatava valmistise kontsentratsioon. Kui uuritakse vedelat lõppsaadust või segu, võib lahjendamata katseaine kasutamine, s.t konstantse kontsentratsiooni juures, olla siiski olulisem nimetatud aine hilisemal riskianalüüsil. See on mõnede reguleerivate asutuste nõue. Kummalgi juhul ei tohi manustamisel ületada annuse suurimat mahtu. Vedeliku suurim ühekordselt manustatav maht sõltub katselooma suurusest. Näriliste puhul ei tohiks maht tavaliselt ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta: vesilahuste puhul võib siiski manustada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Annuse valmistise koostamiseks on soovitav võimaluse korral kasutada vesilahust/suspensiooni/emulsiooni, tähtsuse järjekorras oleks järjestus lahus/suspensioon/emulsioon õlis (nt maisiõli) ja seejärel muudel kandeainetel põhinev lahus. Veest erinevate kandeainete puhul peaks kandeaine toksikoloogilised omadused olema teada. Annused tuleb valmistada ette natuke aega enne manustamist, välja arvatud juhul, kui valmistise stabiilsus sellel ajavahemikul, mil seda kasutatakse, on teada ja näib aktsepteeritav.

1.5. PROTSEDUUR

1.5.1. **Annuste manustamine**

Katseainet manustatakse ühekordse annusena söögitoru kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Erandkorras, kui ühekordne annus ei ole võimalik, võib annust manustada väiksemates osades kuni 24 tunni jooksul.

Loomad peaksid enne doosi manustamist paastuma (nt rotte hoitakse söömata terve öö ja hiiri 3–4 tundi, üksnes vesi on saadaval). Paastumise järel loomi kaalutakse ja manustatakse katseaine. Pärast aine manustamist võib hoida rotte söömata veel 3–4 tundi ja hiiri 1–2 tundi. Kui annust manustatakse osadena teatud ajavahemiku jooksul, võib sõltuvalt ajavahemiku pikkusest osutuda vajalikuks anda loomadele toitu ja vett.

1.5.2. **Eelkatse**

Eelkatse eesmärk on võimaldada valida põhiuuringu tarbeks sobiv lähteannus. Katseainet manustatakse üksikutele loomadele järk-järgult lisas 1 toodud vooskeemide kohaselt. Eelkatse on lõpetatud siis, kui saab langetada otsuse põhikatse lähteannuse kohta (või kui tuvastatakse surm madalaima kindla annuse puhul).

Eelkatse lähteannus valitakse kindlate annusmäärade 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg hulgast annusena, mis eeldatavasti põhjustab ilmset mürgisust, mis võimaluse korral põhineb sama kemikaali või struktuurselt sarnaste kemikaalidega sooritatud *in vivo* ja *in vitro* katsete andmetel. Sellise teabe puudumise korral on lähteannuseks 300 mg/kg.

Iga looma korral on manustamiste vahel vähemalt 24tunnine vahemik. Kõiki loomi jälgitakse vähemalt 14 päeva.

▼B

Maksimaalset kindla annuse määra 5 000 mg/kg võidakse kasutada erandkorras või siis, kui see on põhjendatud konkreetsete normatiivsete vajadustega (vt 3. lisa). Loomade heaolu pärast ei ole soositud loomkatsete tegemisel GHS 5. kategooria (2 000–5 000 mg/kg) annus ja seda tuleks kasutada üksnes siis, kui on eriti tõenäoline, et sellise katse tulemustel on otsene tähtsus inimeste ja loomade tervise või keskkonna kaitsmiseks.

Juhul kui loom, kelle peal katsetati madalaimat kindla annuse määra (5 mg/kg), eelkatse käigus sureb, on tavapäraseks toiminguks uuringu peatamine ja aine klassifitseerimine GHS 1. kategooriasse (nagu on näidatud 1. lisas). Kui on siiski nõutav klassifitseerimise täiendav kinnitamine, võib teha järgmise valikulise lisaprotseduuri. Teisele loomale manustatakse annus 5 mg/kg. Kui teine loom sureb, siis kinnitab see GHS 1. kategooriat ja katse lõpetatakse kohe. Kui teine loom jääb ellu, siis manustatakse maksimaalselt kolmele täiendavale loomale annus 5 mg/kg. Kuna suremuse risk on suur, tuleb ainet manustada kõnealustele loomadele ükshaaval, et tagada nende heaolu. Ajavahemik igale loomale annuse manustamise vahel peab olema piisav selleks, et eelmine loom jääks tõenäoliselt ellu. Kui teine loom sureb, lõpetatakse viivitamata annustamine ja rohkematele loomadele doose ei manustata. Kuna teise surma juhtum (olenemata uuritud loomade arvust katse lõpetamise hetkel) kuulub tulemuse kategooriasse A (kaks või enam surma), järgitakse 5 mg/kg fikseeritud annuse puhul 2. lisas toodud klassifitseerimisreeglit (1. kategooria, kui on kaks või enam surmajuhtumit, või 2. kategooria, kui on vaid üks surmajuhtum). Lisaks sellele antakse 4. lisas juhiseid EL süsteemi kohase klassifitseerimise kohta enne uue GHSi kasutuselevõttu.

1.5.3. **Põhiuuring**

1.5.3.1. *Loomade arv ja annusemäärad*

Lähteannuse tasemel katsete tegemise järel võetavad meetmed on esitatud 2. lisas toodud vooskeemides. Üks kolmest meetmest on nõutav; kas katse peatamine või sobiva ohuklassi määramine, katse sooritamine suurema kindla annusega või väiksema kindla annusega. Loomade kaitsmiseks ei kasutata põhiuuringus uuesti eelkatses surma põhjustanud annusemäära (vt 2. lisa). Kogemused on näidanud, et kõige tõenäolisem tulemus läheannuse tasemel on see, et ainet on võimalik klassifitseerida ja täiendavaid katseid ei ole vaja teha.

Igal uuritava annusemäära korral kasutatakse tavaliselt kokku viit ühest soost looma. Nende viie looma hulka kuulub üks loom eelkatsest, kellele manustati valitud annusemäärale vastav annus, ja veel neli looma (v.a harvaesineval juhul, kui põhiuuringus kasutatav annusemäär ei sisaldunud eelkatses).

Annustamistevaheline ajavahemik iga annusemäära korral määratakse kindlaks mürgisuse tunnuste ilmnemise, kestuse ja ägeduse järgi. Järgmise annuse manustamist tuleb edasi lükata, kuni juba doosi saanud loomade ellujäämine on kindel. Vajaduse korral soovitatakse annustamistevaheliseks ajaks jätta iga annusemäära puhul 3 või 4 päeva, et võimaldada jälgida viivitunud mürgisust. Ajavahemikku võib vajaduse korral korrigeerida, nt ebaselge vastuse puhul.

▼B

Kui kasutatakse kõrgeimat kindlat annust 5 000 mg/kg, tuleks järgida 3. lisas esitatud protseduuri (vt ka punkti 1.6.2).

1.5.3.2. *Piirsisalduskatse*

Piirkatset kasutatakse peamiselt olukordades, kus katse tegijal on teavet selle kohta, et katsematerjal ei ole tõenäoliselt mürgine, s.t selle mürgisus ületab üksnes normatiivseid piirannuseid. Teavet katsematerjali mürgisuse kohta võib saada samalaadseid uuritud ühendeid või segusid või tooteid käsitlevatest teadmistest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisosade olemust ja protsendimäära. Sellistel juhtudel, kui on vähe teavet mürgisuse kohta või see puudub üldse või mil katsematerjal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse.

Käesoleva juhise kohase piirkatsena võidakse tavalist protseduuri kasutades kasutada eelkatset, mille lähteannus on 2 000 mg/kg (või erandkorras 5 000 mg/kg), mille järel manustatakse veel neljale loomale sama annus.

1.6. VAATLUSED

Loomi jälgitakse individuaalselt pärast annustamist vähemalt esimese 30 minuti jooksul, perioodiliselt esimese 24 tunni jooksul, erilist tähelepanu pööratakse esimese 4 tunni jooksul ja seejärel iga päev, kokku 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui loomad tuleb kõrvaldada uuringust ja surmata humaanselt nende heaolu pärast või kui loomad leitakse surnuna. Vaatluse kestust ei tuleks siiski jäigalt määratleda. See tuleks kindlaks määrata toksiliste reaktsioonide, nende algushetke ja taastusperioodi pikkuse põhjal ja seda võib seega vajaduse korral pikendada. Mürgisuse nähtude ilmumise ja kadumise aeg on tähtis, eriti siis, kui on tendents, et mürgisusnähud võivad ilmneda hilistumisega (11). Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed.

Täiendavad vaatlused on vajalikud siis, kui loomadel on jätkuvalt mürgisuse tunnused. Vaatlused peaksid hõlmama muutusi nahal ja karvkattes, silmades ja limaskestades ning samuti muutusi hingamissüsteemis, vereringes, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses tegevuses ja käitumises. Tähelepanu peaks olema suunatud värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma jälgimisele. Arvesse tuleks võtta humaansete lõpetamiskriteeriumide juhisdokumendis esitatud põhimõtteid ja kriteeriume (8). Suremas olevad loomad või loomad, kellel on tugev valu või tugeva kannatuse kestvad tunnused, tuleks surmata humaanselt. Kui loomad surmatakse humaansel viisil või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

1.6.1. **Kehamass**

Iga looma mass tuleks määrata kindlaks veidi enne katseaine manustamist ja seejärel vähemalt kord nädalas. Massi muutused tuleks arvutada ja protokollida. Katse lõpus ellujäänud loomad kaalutakse ja siis surmatakse humaanselt.

▼B

1.6.2. **Patoloogia**

Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse. Kõik üldpatoloogilised muutused tuleks iga looma puhul protokollida. Esialgse annustamise järel 24 või enam tundi elus püsinud loomade üldpatoloogiliste muutustega organeid võidakse samuti uurida mikroskoopiliselt, kuna see võib anda kasulikku teavet.

2. **ANDMED**

Tulemused esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleb kõik andmed esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates ära iga katserühma puhul osalevate loomade arvu, mürgisusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahangul tehtud leiud.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama vastavalt vajadusele järgmist teavet.

Katseaine:

— füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerumine);

— identifitseerimiseks vajalikud andmed, kaasa arvatud CASi number.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valiku põhjendus, kui see on veest erinev.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved;

— loomade mikrobioloogiline seisund, kui see on teada;

— loomade arv, vanus ja sugu (sh vajaduse korral põhjendus isasloomade kasutamise kohta emasloomade asemel);

— päritolu, pidamistingimused, toitumine jne.

Katsetingimused:

— katseaine valmistamise üksikasjalikud andmed, sh üksikasjalikud andmed manustatava aine füüsilise oleku kohta;

— katseaine manustamise üksikasjad, sh annuste mahud ja annustamise aeg;

— üksikasjalikud andmed toidu ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);

— põhjendus lähteannuse valikuks.

▼B

Tulemused:

— tabelid iga looma (st loomad, kellel on mürgistustunnused, kaasa arvatud suremus, mõjude laad, ägedus ja kestus) reageerimise andmete ja annusemäärade kohta;

— tabelid kehamassi ja kehamassi muutuste kohta;

— iga looma mass annustamispäeval, seejärel nädalaste intervallidega ja surma- või surmamishetkel;

— surma kuupäev ja kellaaeg juhul, kui loom sureb enne kavandatud surmamist;

— iga looma korral mürgistusnähtude algusaeg ja nende võimalik taandumine;

— iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine.

Järeldused.

4. **VIITED**

1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85–92.

2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279–291.

3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Felling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469–482.

4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313–324.

5) Stallard, N. and Whitehead, A. (199 5). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183–196.

7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Pariis

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

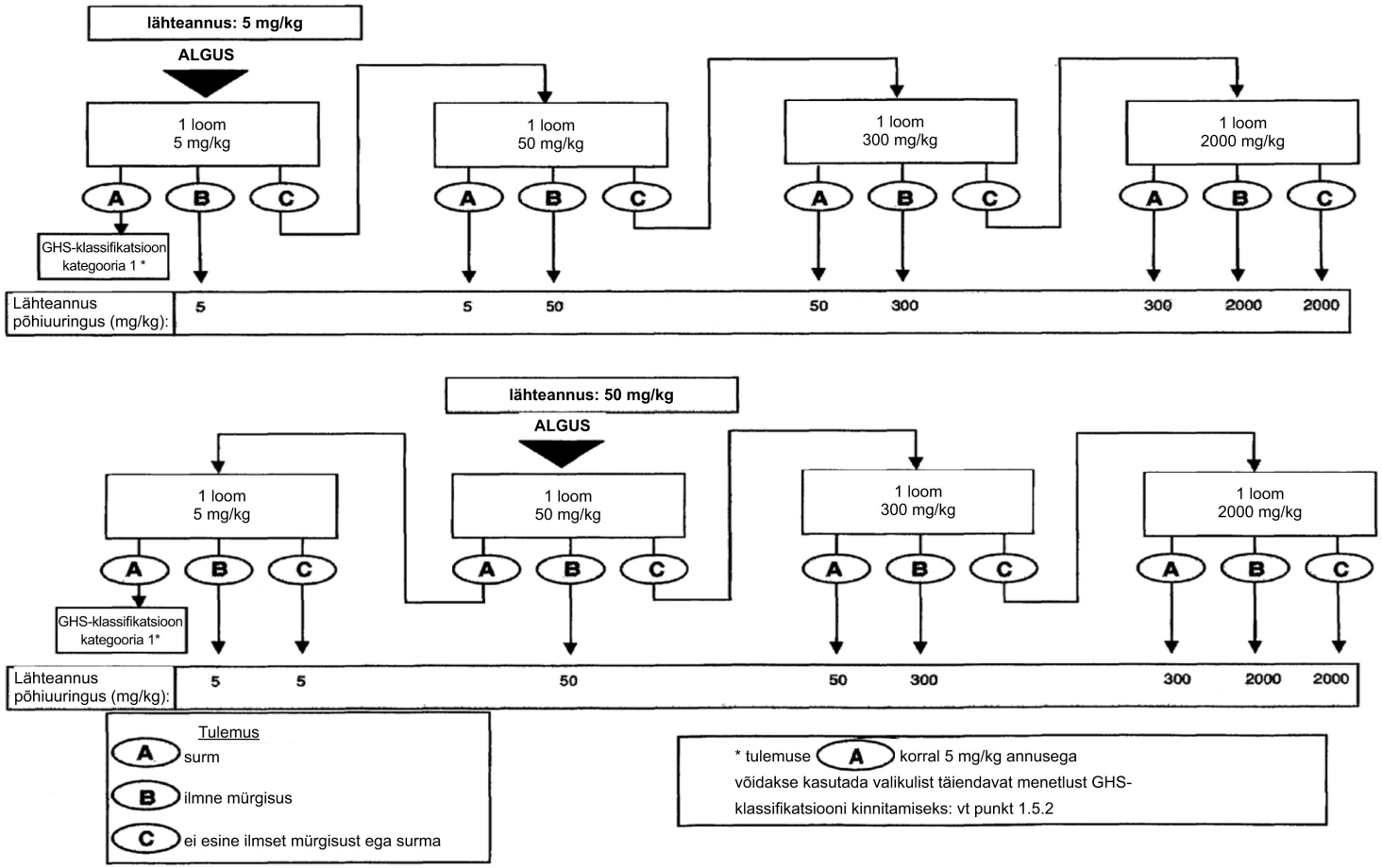
9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.Org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

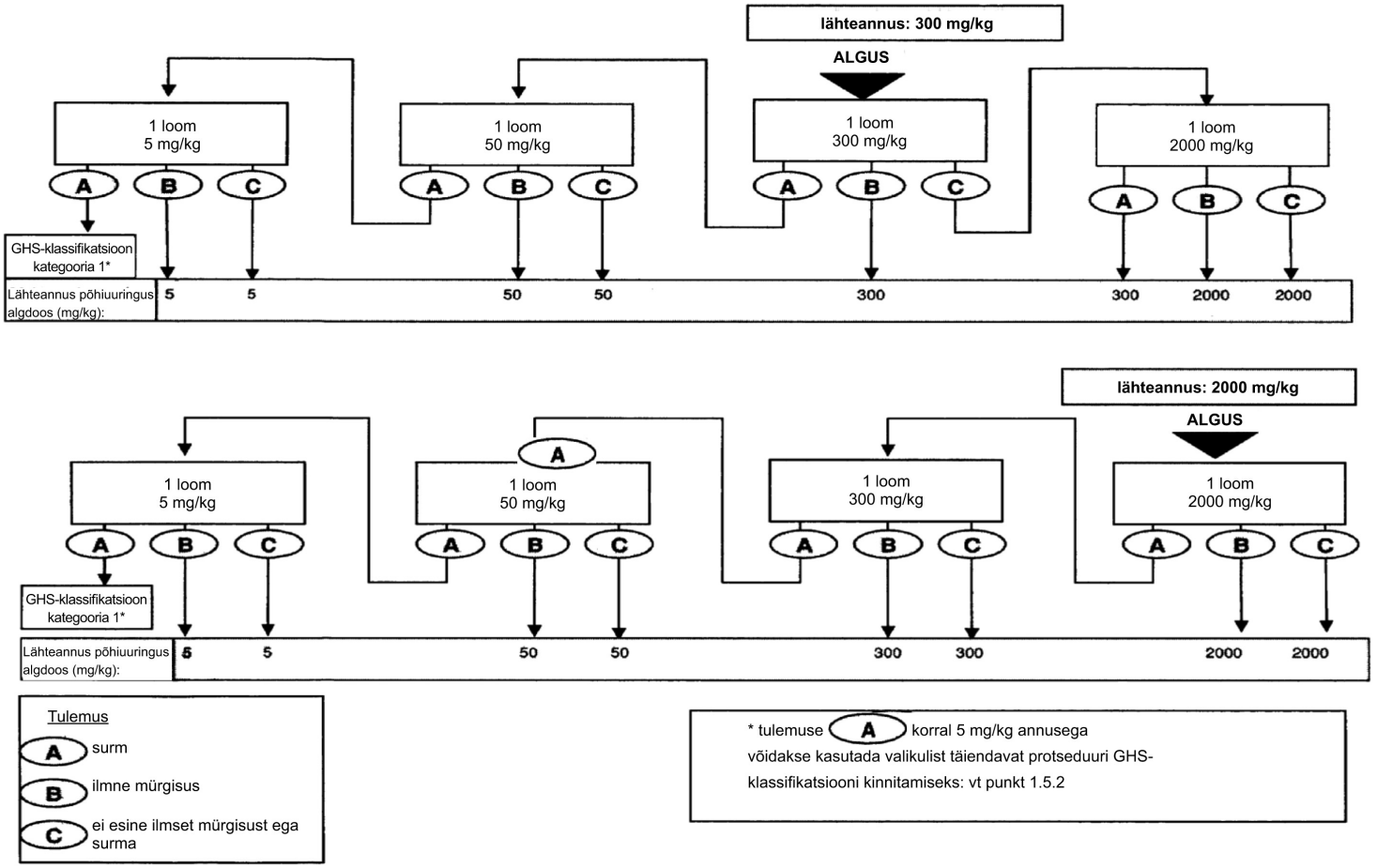
10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P, Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, JA. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223–231.

11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

1. LISA

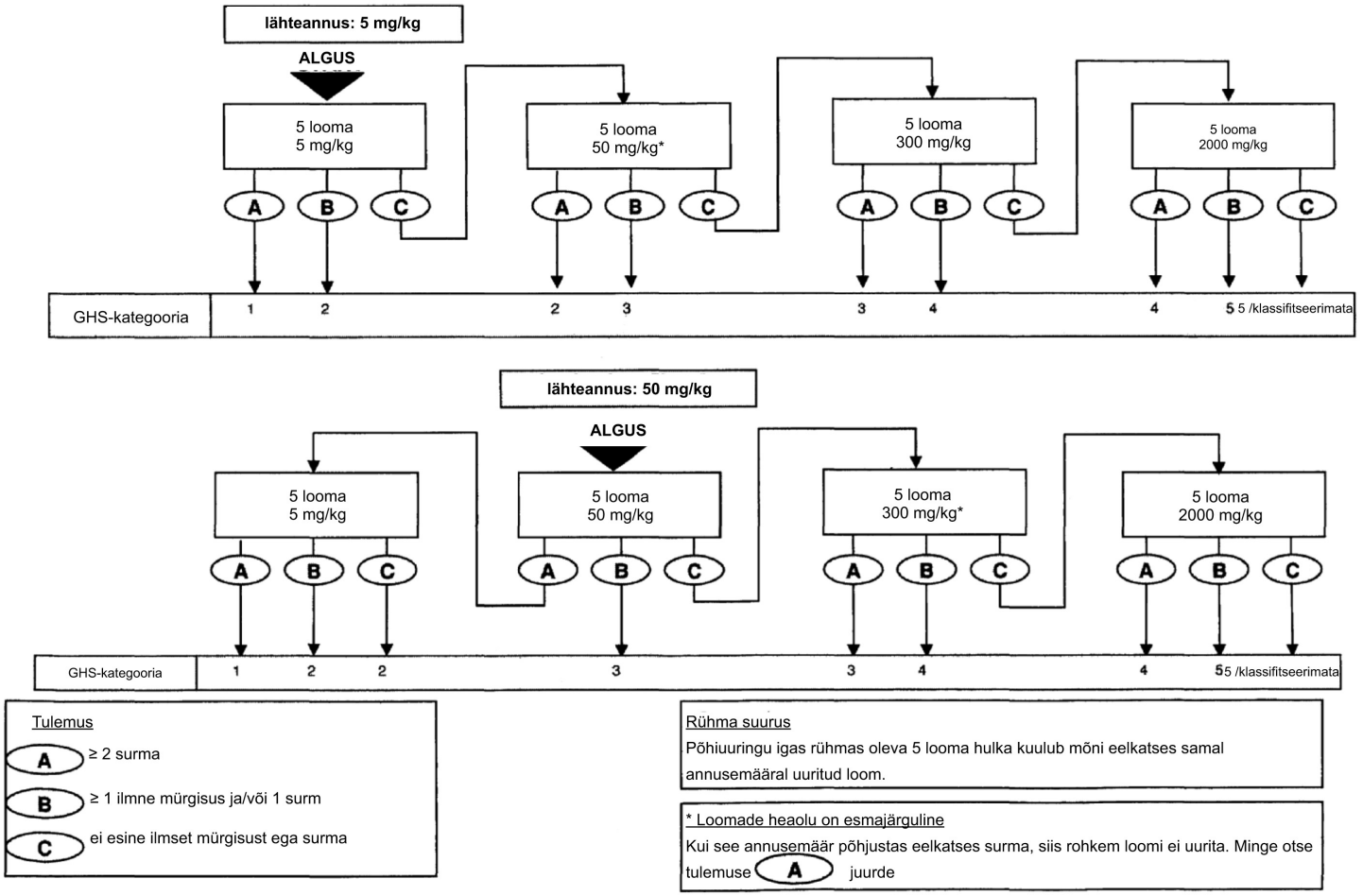
EELKATSE VOOSKEEM



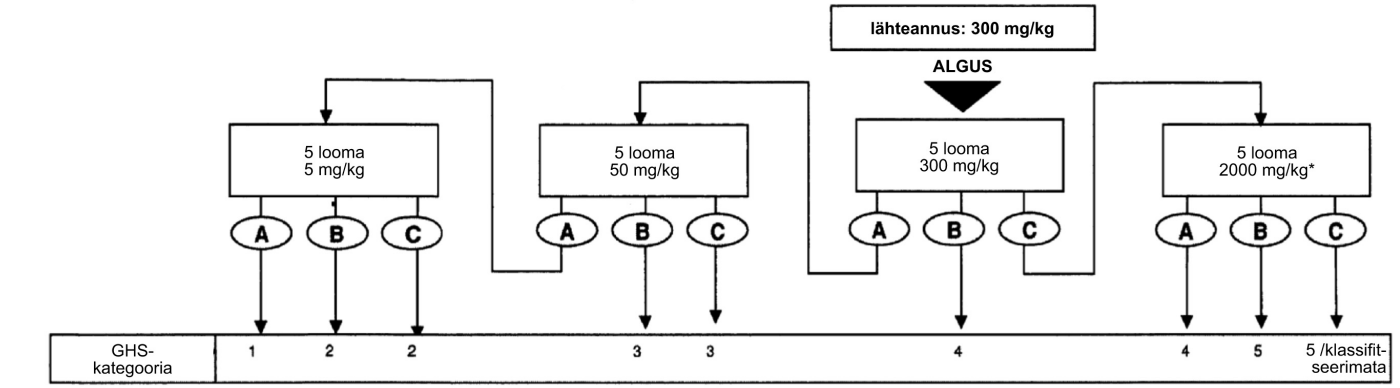

lähteannus: 300 mg/kg
ALGUS
1 loom
5 mg/kg
1 loom
50 mg/kg
1 loom
300 mg/kg
1 loom
2000 mg/kg
A
B
C
GHS-klassifikatsioon kategooria 1*
Lähteannus põhiuuringus algdoos (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
lähteannus: 2000 mg/kg
ALGUS
1 loom
5 mg/kg
1 loom
50 mg/kg
1 loom
300 mg/kg
1 loom
2000 mg/kg
GHS-klassifikatsioon kategooria 1*
Lähteannus põhiuuringus algdoos (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Tulemus
A surm
B ilmne mürgisus
C ei esine ilmset mürgisust ega surma
* tulemuse A korral 5 mg/kg annusega võidakse kasutada valikulist täiendavat protseduuri GHS-klassifikatsiooni kinnitamiseks: vt punkt 1.5.2

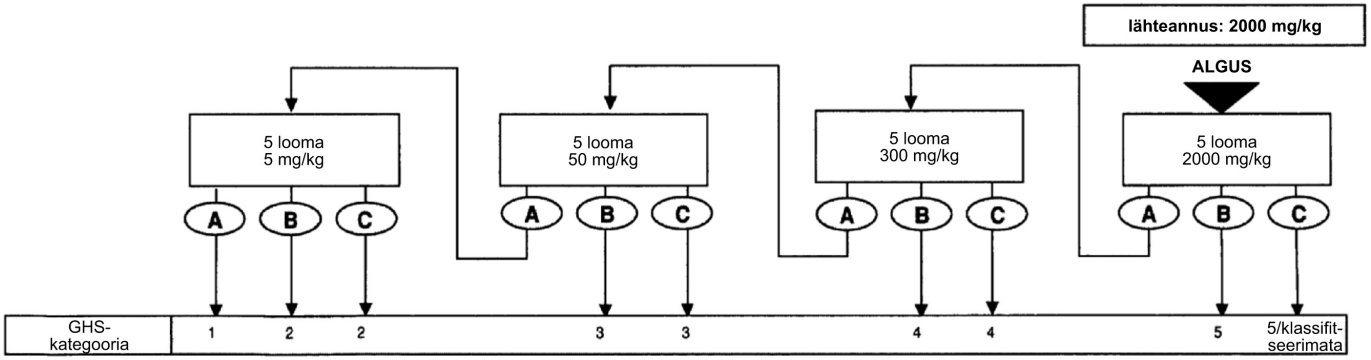
2. LISA

PÕHIUURINGU VOOSKEEM



▼B





Tulemus

A ≥ 2 surma

B ≥ 1 ilmne mürgisus ja/või 1 surm

C ei esine ilmset mürgisust ega surma

Rühma suurus

Põhiuuringu igas rühmas oleva 5 looma hulka kuulub mõni eelkatses samal annusemääral uuritud loom.

* Loomade heaolu on esmajärguline

Kui see annusemäär põhjustas eelkatses surma, siis rohkem loomi ei uurita. Minge otse tulemuse A juurde.

▼B

3. Lisa

KRITEERIUMID SELLISTE KATSEAINETE KLASSIFITSEERIMISE JAOKS, MILLE KORRAL OODATAVAD LD_{50} VÄÄRTUSED ÜLETAVAD 2 000 MG/KG JA MIDA EI OLE VAJA UURIDA

Ohukategooriat 5 käsitlevad kriteeriumid on ette nähtud selliste katseainete identifitseerimiseks, mille korral on ägeda mürgisuse oht suhteliselt madal, kuid mis teatud tingimustel võivad ohustada tundlikke populatsioone. Nimetatud ainete LD_{50} väärtused on oodatavalt vahemikus 2 000–5 000 mg/kg suu- või nahakaudsel manustamisel või samaväärsete annustena muude manustamisviiside korral. Katseained võidakse klassifitseerida ohukategooriasse, mis on määratletud tingimusega: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (GHS-kategooria 5), järgmistel juhtudel:

a) kui on suunatud nimetatud kategooriasse lisas 2 toodud mis tahes katsekava korral, mis põhineb surmajuhtumitel;

b) kui on juba olemas usaldusväärsed tõendid, mis näitavad, et LD_{50} väärtus asub kategooriale 5 vastavas vahemikus, või muud loomauuringud või toksilised mõjud inimestel osutavad sellele, et ainel on vahetu mõju inimese tervisele;

c) andmete ekstrapoleerimise, hindamise või mõõtmise alusel, kui määramine ohtlikumasse kategooriasse ei ole põhjendatud, ja

   — usaldusväärse teabe olemasolul oluliste toksiliste mõjude kohta inimestele või

   — kui täheldatakse suremust suukaudse manustamisega katsetes kuni kategooriale 4 vastavate väärtusteni või

   — kui eksperdiarvamus kinnitab mürgisuse olulisi kliinilisi tunnuseid katsetamisel kuni kategooriale 4 vastavate väärtusteni, välja arvatud kõhulahtisus, piloerektsioon või hoolitsemata välimus, või

   — kui eksperdiarvamus kinnitab usaldusväärset teavet võimalike märkimisväärsete ägedate mõjude kohta muude loomauuringute põhjal.

KATSETAMINE 2 000 MG/KG ÜLETAVATE ANNUSTEGA

Maksimaalset kindlat annust 5 000 mg/kg võidakse kasutada erandkorras või siis, kui see on põhjendatud konkreetsete normatiivsete vajadustega. Tunnistades vajadust kaitsta loomade heaolu, ei kiideta katsetamist annustega 5 000 mg/kg heaks ja seda kasutatakse üksnes siis, kui on suur tõenäosus, et sellise katse tulemused oleks otseselt seotud loomade või inimeste tervise kaitsega (9).

Eeluuring

1. lisas esitatud järjestamist reguleerivate otsuste eeskirju laiendatakse annusemäära 5 000 mg/kg kohta. Seetõttu, kui kasutatakse eeluuringus lähteannusena 5 000 mg/kg, eeldab tulemus A (surm) teise looma korral katse tegemist annusega 2 000 mg/kg; tulemused B ja C (ilmne mürgisus või ei esine mürgisust) lubavad valida põhiuuringus lähteannuseks 5 000 mg/kg. Analoogiliselt, kui lähteannusena kasutatakse 5 000 mg/kg erinevat annust, jätkatakse katset kuni annuseni 5 000 mg/kg sellisel juhul, kui annusega 2 000 mg/kg on tulemus B või C. Kui annusega 5 000 mg/kg on tulemuseks A, on põhiuuringus lähteannuseks 2 000 mg/kg. Kui tulemuseks saadaks B ja C, on põhiuuringus algdoosiks lähteannuseks 5 000 mg/kg.

▼B

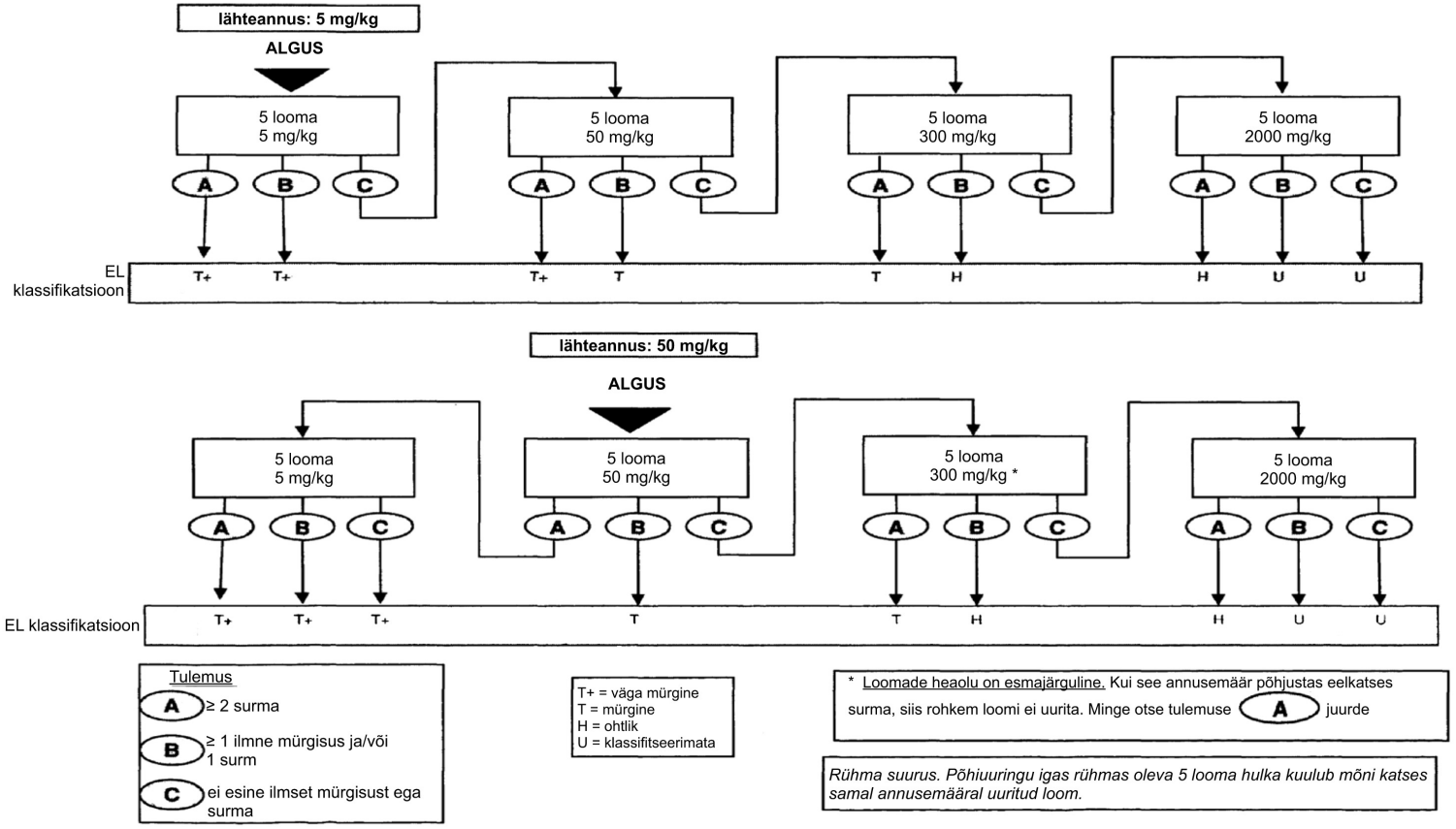
Põhiuuring

2. lisas esitatud järjestamist reguleerivate otsuste eeskirju laiendatakse annusemäära 5 000 mg/kg kohta. Seetõttu, kui kasutatakse põhiuuringus lähteannusena 5 000 mg/kg, eeldab tulemus A (≥2 surma) teise rühmaga katse tegemist annusega 2 000 mg/kg; tulemuste B (ilmne mürgisus ja/või ≤1 surm) või C (ei esine mürgisust) puhul on tulemuseks see, et ainet ei klassifitseerita vastavalt GHSile. Analoogiliselt, kui lähteannusena kasutatakse 5 000 mg/kg erinevat annust, jätkatakse katset kuni annuseni 5 000 mg/kg sellisel juhul, kui annusega 2 000 mg/kg on tulemus C. Kui annusega 5 000 mg/kg on tulemuseks A, klassifitseeritakse aine GHS 5. kategooriasse. Tulemuste B või C puhul jääb aine klassifitseerimata.

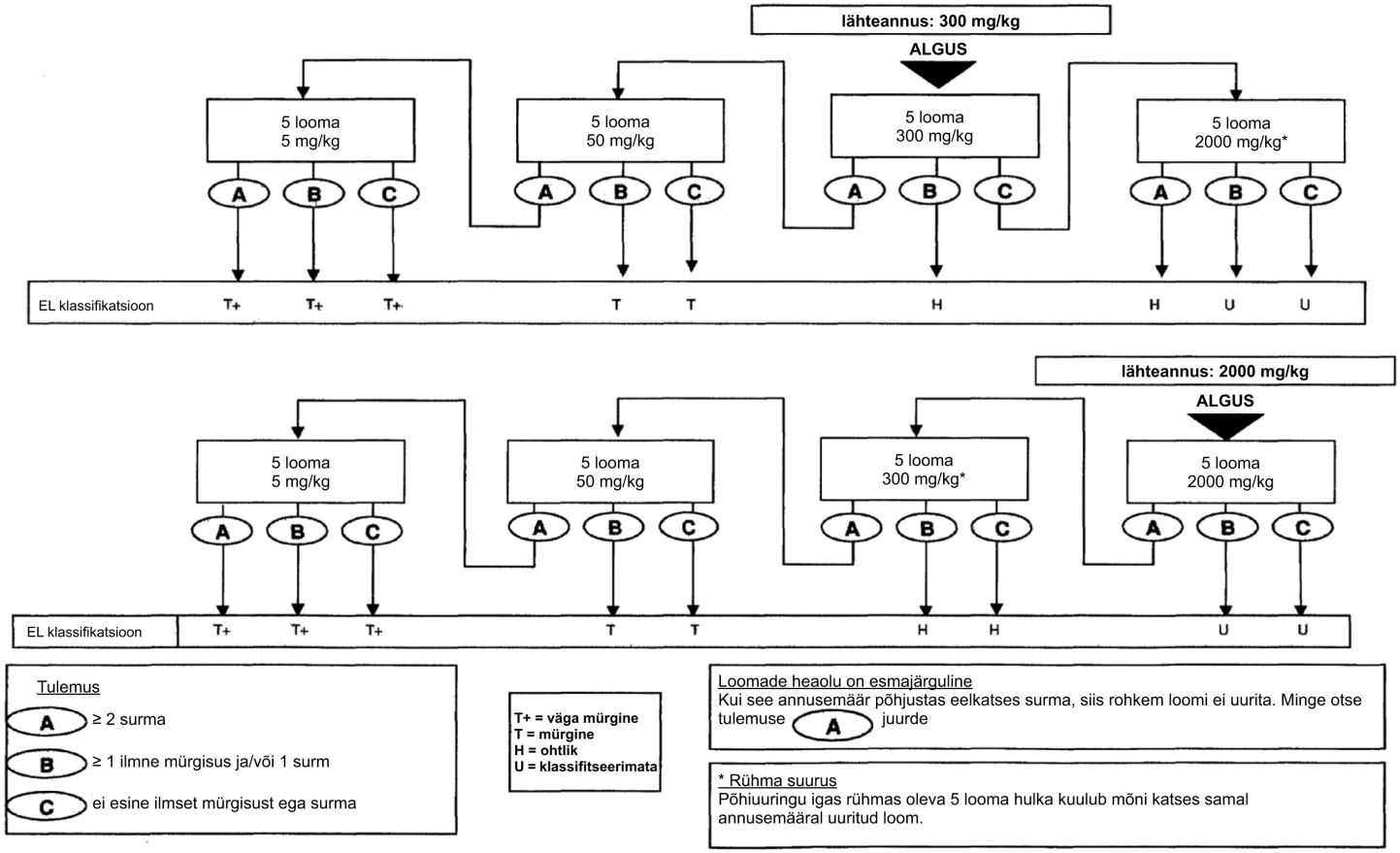
Lisa 4

KATSEMEETOD B.1a

EÜ süsteemi kohased klassifitseerimisjuhised, mida kasutatakse üleminekuperiodil kuni globaalselt harmoneeritud süsteemi (GHS) täieliku rakendamiseni (viites (8))



▼B


lähteannus: 300 mg/kg
ALGUS
5 looma
5 mg/kg
5 looma
50 mg/kg
5 looma
300 mg/kg
5 looma
2000 mg/kg*
A B C
EL klassifikatsioon
T+ T+ T+ T T H H U U
lähteannus: 2000 mg/kg
ALGUS
5 looma
5 mg/kg
5 looma
50 mg/kg
5 looma
300 mg/kg*
5 looma
2000 mg/kg
EL klassifikatsioon
T+ T+ T+ T T H H U U
Tulemus
A ≥ 2 surma
B ≥ 1 ilmne mürgisus ja/või 1 surm
C ei esine ilmset mürgisust ega surma
T+ = väga mürgine
T = mürgine
H = ohtlik
U = klassifitseerimata
Loomade heaolu on esmajärguline
Kui see annusemäär põhjustas eelkatses surma, siis rohkem loomi ei uurita. Minge otse tulemuse A juurde
* Rühma suurus
Põhiuuringu igas rühmas oleva 5 looma hulka kuulub mõni katses samal annusemääral uuritud loom.

▼B

B.1b. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – ÄGEDA MÜRGISUSASTME MEETOD

1. MEETOD

See katsemeetod on samaväärne OECD TG 423ga (2001).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolevas katses sätestatud ägeda mürgisusastme meetod (1) on astmeline meetod, mille igal etapil kasutatakse kolme samast soost looma. Olenevalt loomade suremusest ja/või sellest, kas loomad on suremas, on katseaine ägeda mürgisuse hindamiseks vaja keskmiselt 2–4 etappi. Käesolev protseduur on korratav, selles kasutatakse väga vähe loomi. Selle abil võidakse järjestada ained nii nagu muude ägeda mürgisuse katsemeetodite puhul. Ägeda mürgisusastme meetod põhineb biomeetrilistel hindamistel (2, 3, 4, 5), kus kasutatakse kindlaid annuseid, mis on üksteisest piisavalt eraldatud aine klassifitseerimise eesmärgil ja ohu hindamiseks. 1996. aastal vastuvõetud meetodit valideeriti ulatuslikult *in vivo*, võrreldes kirjandusest saadud LD_{50} väärtusi käsitlevaid andmeid nii riiklikul (6) kui ka rahvusvahelisel tasandil (7).

Juhised antud eesmärgi saavutamiseks kõige sobivama katsemeetodi valimiseks võib leida ägeda suukaudse mürgisuse katseid käsitlevast (8) juhisdokumendist. Nimetatud juhisdokument sisaldab samuti lisateavet B.1b katsemeetodi rakendamise ja tõlgendamise kohta.

Katseaineid ei ole vaja manustada annustes, mis teadaolevalt põhjustavad märkimisväärset valu ja kannatusi sööbiva või tugeva ärritava toime tõttu. Suremas olevad loomad ja loomad, kes kannatavad ilmselgelt valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks surmata humaanselt; need loomad võetakse arvesse katsetulemuste tõlgendamisel samamoodi nagu katse käigus surnud loomi. Eraldi juhisdokumendis (9) on esitatud kriteeriumid, mille alusel tehakse otsus suremas olevate või tõsiselt kannatavate loomade surmamise kohta, ning juhised prognoositava või ähvardava surma äratundmiseks.

Meetod kasutab kindlaks määratud annuseid ja tulemused võimaldavad aineid järjestada ja klassifitseerida vastavalt ägedat mürgisust põhjustavate kemikaalide klassifitseerimist käsitlevale globaalselt harmoneeritud süsteemile (10).

Põhimõtteliselt ei ole meetod ette nähtud võimaldama arvutada täpset LD_{50} annust, kuid võimaldab kindlaks määrata määratletud kokkupuutevahemikku, kus suremus on eeldatav, kuna käesoleva katse põhipunkt on endiselt see, et osa loomi sureb. Meetod võimaldab kindlaks määrata LD_{50} väärtuse üksnes siis, kui vähemalt kaks annust põhjustavad suremuse, mis on 0 %st suurem ja 100 %st väiksem. Tänu kindlaksmääratud annuste valikule sõltumata katseainest, ja klassifitseerimise selgelt väljendatud seosele erinevas seisundis täheldatud loomade arvuga on laborite aruanded järjepidevamad ja korratavamad.

▼B

Katselaboratoorium võtab arvesse kogu katseaine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave sisaldab aine nimetust ja keemilist struktuuri, selle füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või in *vivo* tehtud mürgisuskatsete tulemusi, struktuurilt sarnaste ainete toksikoloogilisi andmeid ja aine eeldatavat otstarvet. Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks ja aitab valida sobivat lähteannust.

1.2. MÕISTED

Äge suukaudne mürgisus – viitab sellistele kahjulikele mõjudele, mis ilmnevad pärast aine suukaudselt manustamist ühekordse annuse või seeriaviisiliste annustena 24 tunni jooksul.

Edasilükkunud surm – loom ei sure ega näi olevat suremas 48 tunni jooksul, kuid sureb hiljem, 14päevase jälgimisperioodi jooksul.

Annus – manustatava katseaine kogus. Annust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (nt mg/kg).

GHS – Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (keemiliste ainete ja segude globaalselt harmoneeritud klassifitseerimissüsteem). Ühistegevus, milles osalevad OECD (inimeste tervis ja keskkond), ohtlike ainete vedu käsitlev ÜRO eksperdikomitee (füüsikalis-keemilised omadused) ja ILO (ohtudest teavitamine) ning mida koordineerib kemikaalide mõistlikku haldamist käsitlev organisatsioonidevaheline programm (IOMC).

Ähvardav surm – loom on suremas või sureb tõenäoliselt enne järgmist kavandatud jälgimisperioodi. Närilistel võiksid sellisele seisundile viitavateks märkideks olla krambid, külili magamine, loidus ja värin (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (9)).

LD_{50} (surmava suukaudse annuse mediaan) – aine statistiliselt määratletud ühekordne annus, mis tõenäoliselt põhjustab suukaudsel manustamisel surma 50 %l loomadest. LD_{50} väärtust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (mg/kg).

Piirannus – vastab katses kasutatavale maksimaalsele annusele (2 000 või 5 000 mg/kg).

Surmaeelne seisund – loomad, kes on suremas või kes ei suuda ellu jääda ravist hoolimata (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (9)).

Ennustatav surm – selliste kliiniliste tunnuste olemasolu, mis viitavad sellele, et surm saabub teatud aja pärast enne katse kavandatavat lõppu; näiteks suutmatus tarbida vett või toitu (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (9)).

▼B

1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Tuginedes protseduurile, mille kohaselt kasutatakse igal etapil minimaalset arvu loomi, on katse põhimõtteks saada aine klassifitseerimiseks piisavalt teavet katseaine ägeda mürgisuse kohta. Ainet manustatakse katseloomade rühmale suukaudselt ühe kindlaksmääratud doosina. Ainet katsetatakse etapiviisiliselt, igal etapil kasutatakse kolme ühest soost looma (tavaliselt emaslooma). Ühendiga seotud suremuse puudumine või esinemine loomadel, kellele ühel etapil annustati ainet, määrab kindlaks järgmise etapi, s.t:

— lisakatseid ei ole vaja;

— aine sama annus manustatakse veel kolmele loomale;

— ainet manustatakse vastavalt vahetult järgmisele või eelmisele annusemäärale veel kolmele loomale.

Katseprotseduuri üksikasju on kirjeldatud 1. lisas. Meetod võimaldab langetada otsuse seoses katseaine klassifitseerimisega ühte mürgisuse kategooriasse, mis on määratletud kindlaksmääratud LD_{50} piirväärtuse põhjal.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Loomaliikide valik**

Eelistatud näriliste liik on rotid, kuigi võib kasutada ka näriliste teisi liike. Tavaliselt kasutatakse emasloomi (9). Selle põhjuseks on, et tavapäraseid LD_{50} katseid käsitlevad kirjandusülevaated näitavad, et sugupoolte tundlikkuses on vähe erinevusi, kuid neil juhtudel, kui on erinevusi täheldatud, on emasloomad üldiselt veidi tundlikumad (11). Kui struktuurselt sarnaste kemikaalide toksikoloogilisi või toksikokineetilisi omadusi käsitlevatest andmetest nähtub, et isasloomad on tõenäoliselt tundlikumad, siis kasutatakse neid. Kui katse tehakse isasloomadega, tuleks esitada piisav põhjendus.

Kasutatakse noorte tervete täiskasvanud loomade enim kasutatavaid laboritüvesid. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Iga loom peaks annustamise alustamisel olema 8–12 nädalat vana ning tema mass ei tohiks erineda rohkem kui ± 20 % varem annuse saanud loomade keskmisest massist.

1.4.2. **Loomade pidamise ja toitmise tingimused**

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise aja, peaks seda hoidma vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatu hulga joogiveega. Loomad võib grupeerida puuridesse annuse põhjal, kuid puuris olevate loomade arv ei tohiks takistada iga looma selget jälgimist.

▼B

1.4.3. **Loomade ettevalmistamine**

Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise jaoks ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise alustamist, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega.

1.4.4. **Annuste valmistamine**

Üldiselt manustatakse katseaineid kasutatavate annuste vahemikus konstantses mahus nii, et muutub annustatava valmistise kontsentratsioon. Kui uuritakse vedelat lõppsaadust või segu, võib lahjendamata katseaine kasutamine, s.t konstantse kontsentratsiooni juures, olla siiski olulisem nimetatud aine hilisemal riskianalüüsil, ja see on mõnede reguleerivate asutuste nõue. Kummalgi juhul ei tohi ületada manustamisel annuste suurimat mahtu. Vedeliku suurim ühekordselt manustatav maht sõltub katselooma suurusest. Näriliste puhul ei tohiks maht tavaliselt ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta: vesilahuste puhul võib siiski manustada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Annuse valmistise koostamiseks on soovitav võimaluse korral kasutada vesilahust/suspensiooni/emulsiooni, tähtsuse järjekorras oleks järjestus järgmine: lahus/suspensioon/emulsioon õlis (nt maisiõli) ja seejärel muudel kandeainetel põhinev lahus. Veest erinevate kandeainete puhul peaks kandeaine toksikoloogilised omadused olema teada. Annused tuleb valmistada ette natuke aega enne manustamist, välja arvatud juhul, kui valmistise stabiilsus sellel ajavahemikul, mil seda kasutatakse, on teada ja näib aktsepteeritav.

1.5. PROTSEDUUR

1.5.1. **Annuste manustamine**

Katseainet manustatakse ühekordse annusena söögitoru kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Erandkorras, kui ühekordne annus ei ole võimalik, võib annust manustada väiksemates kogustes kuni 24 tunni jooksul.

Loomad peaksid enne doosi manustamist paastuma (nt rotte hoitakse söömata terve öö ja hiiri 3–4 tundi, üksnes vesi on saadaval). Paastumise järel loomi kaalutakse ja manustatakse katseainet. Pärast aine manustamist võib hoida rotte söömata veel 3–4 tundi ja hiiri 1–2 tundi. Kui annust manustatakse osadena teatud ajavahemiku jooksul, võib sõltuvalt ajavahemiku pikkusest osutuda vajalikuks anda loomadele toitu ja vett.

1.5.2. **Loomade arv ja annusemäärad**

Igal etapil kasutatakse kolme looma. Lähteannusena kasutatav annusemäär valitakse üks neljast kindlast suurusest – 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kehamassi kg. Lähteannuse määr peaks olema sellise väärtusega, mis kutsub suurima tõenäosusega esile suremust mõnede loomade hulgas, kellele ainet manustati. 1. lisas toodud vooskeemid kirjeldavad protseduure, mida tuleks järgida iga lähteannuse puhul. Lisaks sellele antakse 4. lisas juhiseid EL süsteemi kohase klassifitseerimise kohta enne uue GHSi kasutuselevõttu.

▼B

Kui olemasolev teave kinnitab, et suremus on ebatõenäoline suurima algdoosi taseme juures (2 000 mg/kg kehamassi kohta), tuleks teha piirkatse. Kui puudub teave uuritava aine kohta, soovitatakse loomade heaolu tagamiseks kasutada algdoosina 300 mg/kg kehamassi kohta.

Katserühmadele annustamiste ajavahemik määratakse kindlaks mürgisustunnuste algushetke, kestuse ja raskuse abil. Järgmise annuse manustamist loomadele tuleb edasi lükata hetkeni, kuni juba annuse saanud loomade ellujäämine on kindel.

Maksimaalset kindla annuse määra 5 000 mg/kg võidakse kasutada erandkorras ja ainult siis, kui see on põhjendatud konkreetsete normatiivsete vajadustega (vt 2. lisa). Loomade heaolu pärast ei ole soositud loomkatsete tegemisel GHS 5. kategooria (2 000 – 5 000 mg/kg) annus ja seda tuleks kasutada üksnes siis, kui on eriti tõenäoline, et sellise katse tulemustel on otsene tähtsus inimeste ja loomade tervise või keskkonna kaitsmisel.

1.5.3. **Piirkatse**

Piirkatset kasutatakse peamiselt olukordades, kus eksperimentaatoril on teavet selle kohta, et katsematerjal ei ole tõenäoliselt mürgine, s.t selle mürgisus ületab üksnes normatiivseid piirannuseid. Teavet katsematerjali mürgisuse kohta võib saada samalaadseid uuritud ühendeid, segusid või tooteid käsitlevatest teadmistest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisosade olemust ja protsendimäära. Sellistel juhtudel, kui on vähe teavet mürgisuse kohta või see puudub üldse või kui katsematerjal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse.

Piirkatse võidakse teha ühel annusemääral (2 000 mg/kg kehamassi kohta) kuue loomaga (kolm looma igal etapil). Erandkorras võib piirkatse teha ühel annusemääral (5 000 mg/kg) kolme loomaga (vt 2. lisa). Kui esineb katseainega seotud suremust, võib sooritada lisakatseid astme võrra madalama annusemääraga.

1.6. VAATLUSED

Loomi jälgitakse individuaalselt pärast annustamist vähemalt esimese 30 minuti jooksul, perioodiliselt esimese 24 tunni jooksul, erilist tähelepanu pööratakse esimese nelja tunni jooksul ja seejärel iga päev kokku 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui loomad tuleb kõrvaldada uuringust ja surmata humaanselt loomade heaolu pärast või kui nad leitakse surnuna. Vaatluse kestust ei tuleks siiski jäigalt määratleda. See tuleks kindlaks määrata toksiliste reaktsioonide, nende algushetke ja taastusperioodi pikkuse põhjal ja seda võib seepärast vajaduse korral pikendada. Mürgisuse nähtude ilmumise ja kadumise aeg on tähtis, eriti siis, kui on tendents, et mürgisusnähud võivad ilmneda hilistumisega (12). Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed.

▼B

Lisavaatlused on vajalikud siis, kui loomadel on jätkuvalt mürgisuse tunnused. Vaatlused peaksid hõlmama muutusi nahal ja karvkattes, silmades ja limaskestades ning samuti muutusi hingamissüsteemis, vereringes, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses tegevuses ja käitumises. Tähelepanu peaks olema suunatud värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma jälgimisele. Arvesse tuleks võtta humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (9) esitatud põhimõtteid ja kriteeriume. Suremas olevad loomad või loomad, kellel on tugev valu või tugeva kannatuse kestvad tunnused, tuleks surmata humaanselt. Kui loomad surmatakse humaansel viisil või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

1.6.1. **Kehamass**

Iga looma mass tuleks määrata kindlaks veidi enne katseaine manustamist ja seejärel vähemalt kord nädalas. Massi muutused tuleks arvutada ja protokollida. Katse lõpus ellu jäänud loomad kaalutakse ja siis surmatakse humaanselt.

1.6.2. **Patoloogia**

Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse. Kõik üldpatoloogilised muutused tuleks iga looma puhul protokollida. Esialgse annustamise järel 24 või enam tundi elus püsinud loomade üldpatoloogiliste muutustega organeid võidakse samuti uurida mikroskoopiliselt, kuna see võib anda kasulikku teavet.

2. **ANDMED**

Andmed esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleb kõik andmed esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates ära iga katserühma puhul osalevate loomade arvu, mürgisusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahangul tehtud leiud.

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseaine:

— füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerumine);

— identifitseerimiseks vajalikud andmed, kaasa arvatud CASi number.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valiku põhjendus, kui see on veest erinev.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved;

▼B

— loomade mikrobioloogiline seisund, kui see on teada;

— loomade arv, vanus ja sugu (sh vajaduse korral põhjendus isasloomade kasutamise kohta emasloomade asemel);

— päritolu, pidamistingimused, toitumine jne.

Katsetingimused:

— katseaine valmistamise üksikasjad, sh üksikasjad manustatava aine füüsilise oleku kohta;

— katseaine manustamise üksikasjad, sh annuste mahud ja annustamise aeg;

— üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);

— põhjendus lähteannuse valikuks.

Tulemused:

— tabelid iga looma (st loomad, kellel on mürgisustunnused, kaasa arvatud suremus, mõjude laad, ägedus ja kestus) reageerimise andmete ja annusemäärade kohta;

— tabelid kehamassi ja kehamassi muutuste kohta;

— iga looma mass annustamispäeval, seejärel nädalaste intervallidega ja surma- või surmamishetkel;

— surma kuupäev ja kellaaeg juhul, kui loom sureb enne kavandatud surmamist;

— iga looma korral mürgisusnähtude algusaeg ja nende võimalik taandumine;

— iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

Tulemuste arutlus ja tõlgendamine.

Järeldused.

4. **VIITED**

1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizitat von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336–341.

3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559–610.

4) Diener W., Mischke U, Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729–734.

5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129–134.

6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455–470.

▼B

7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659–670.

8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

11) Lipnick R.L., Cotruvo, J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Chu I.; Goddard M., Segal L., Springer J.A. and Myers R.C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223–231.

12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

1. LISA

PROTSEDUUR, MIDA JÄRGITAKSE IGA LÄHTEANNUSE PUHUL

ÜLDISED MÄRKUSED

Selles lisas toodud vastavad katsekavad selgitavad protseduuri, mida tuleb järgida iga lähteannuse puhul.

— 1a lisa: lähteannus on 5 mg kg kehamassi kohta

— 1b lisa: lähteannus on 50 mg kg kehamassi kohta

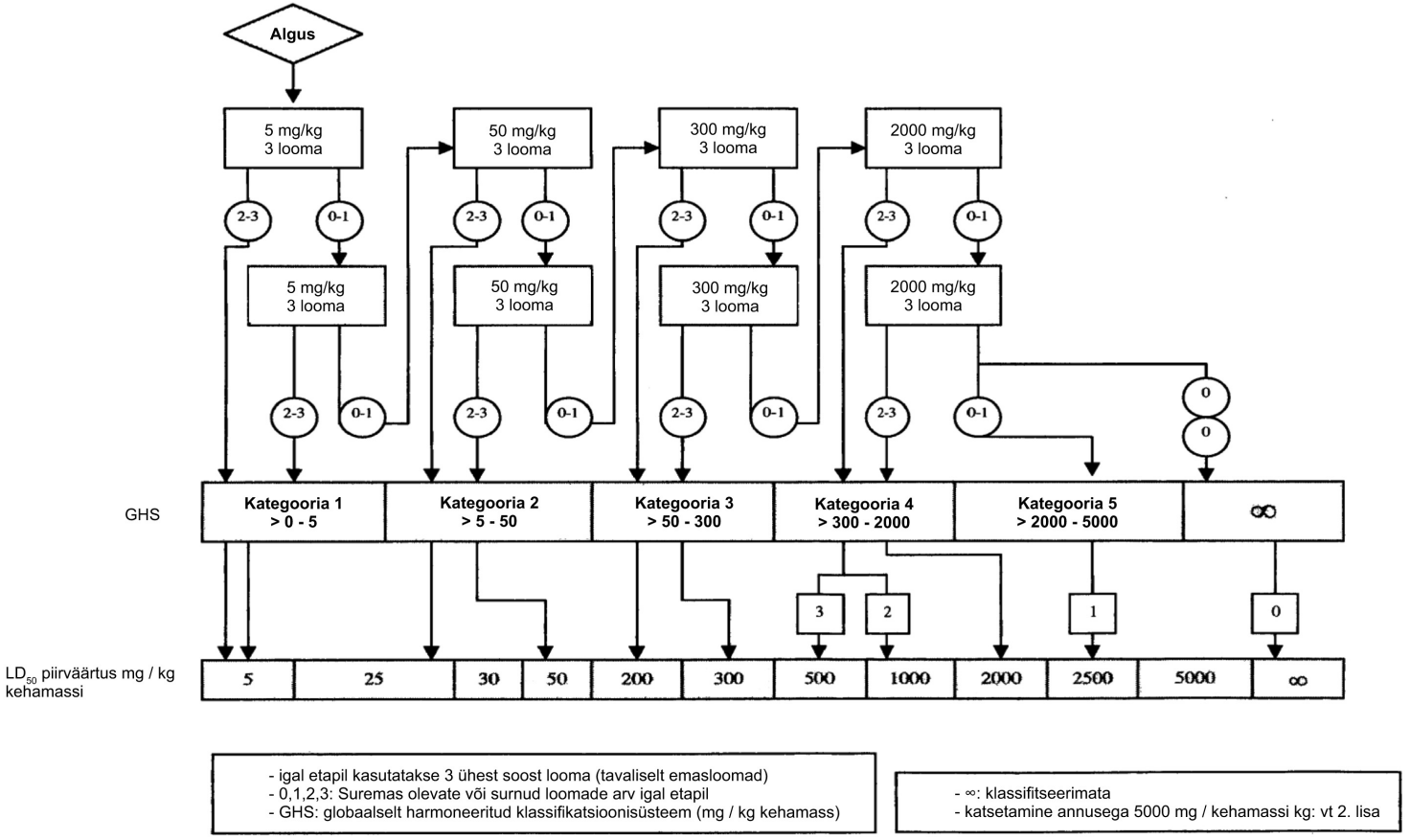
— 1c lisa: lähteannus on 300 mg kg kehamassi kohta

— 1d lisa: lähteannus on 2 000 mg kg kehamassi kohta

Humaanselt surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseprotseduuris vastavalt nooltega näidatud suunale.

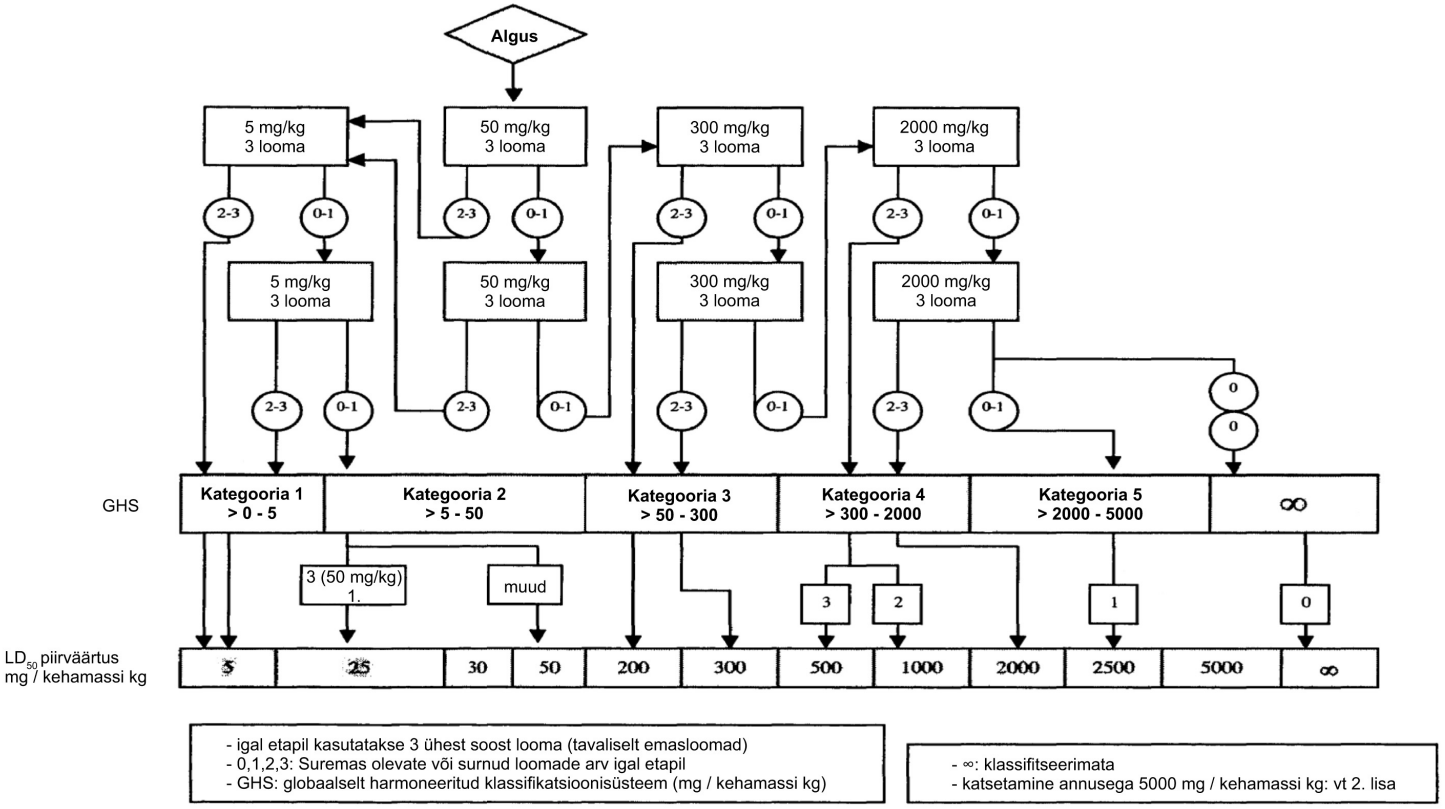
1a LISA

KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 5 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



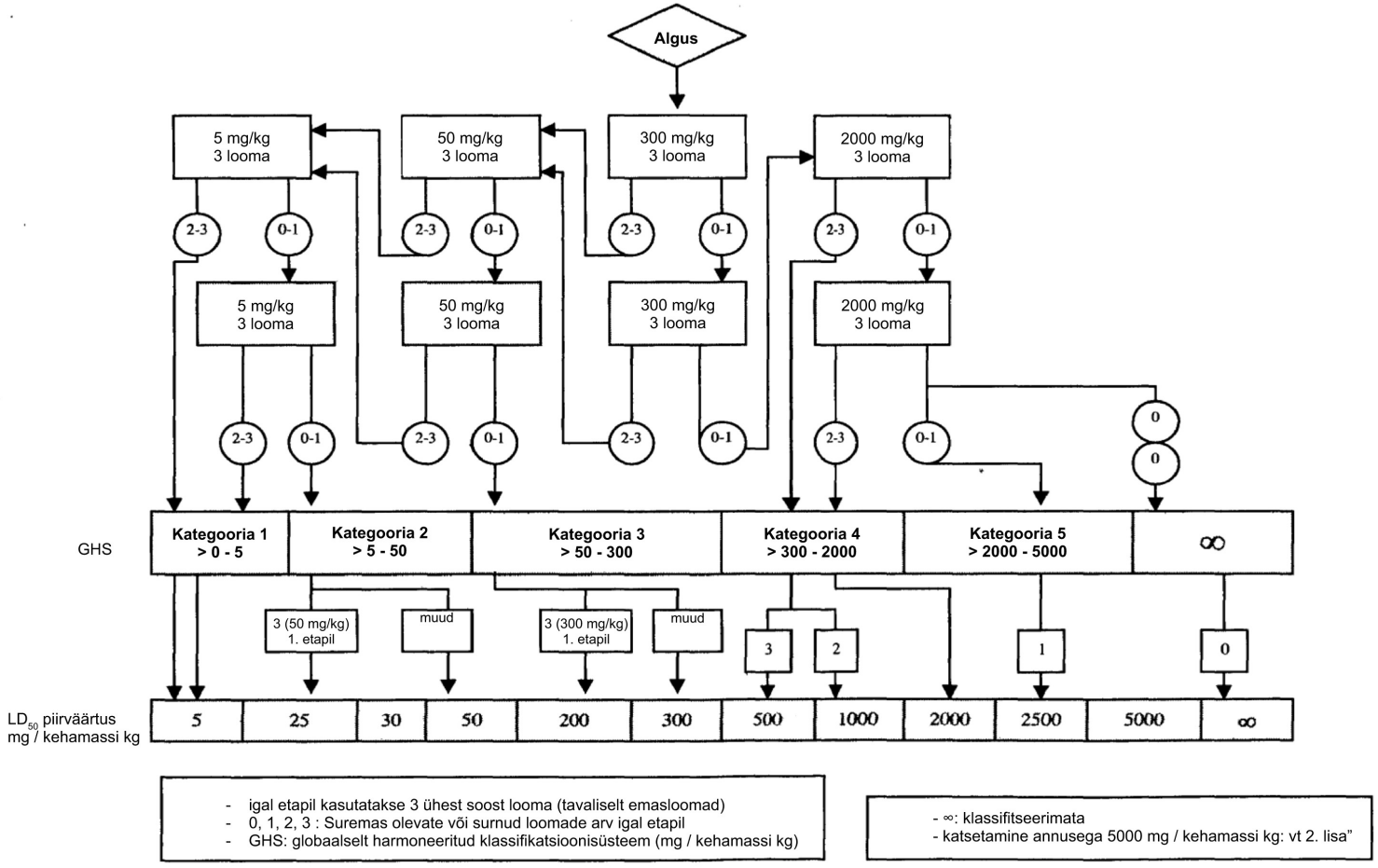
1b LISA

KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 50 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



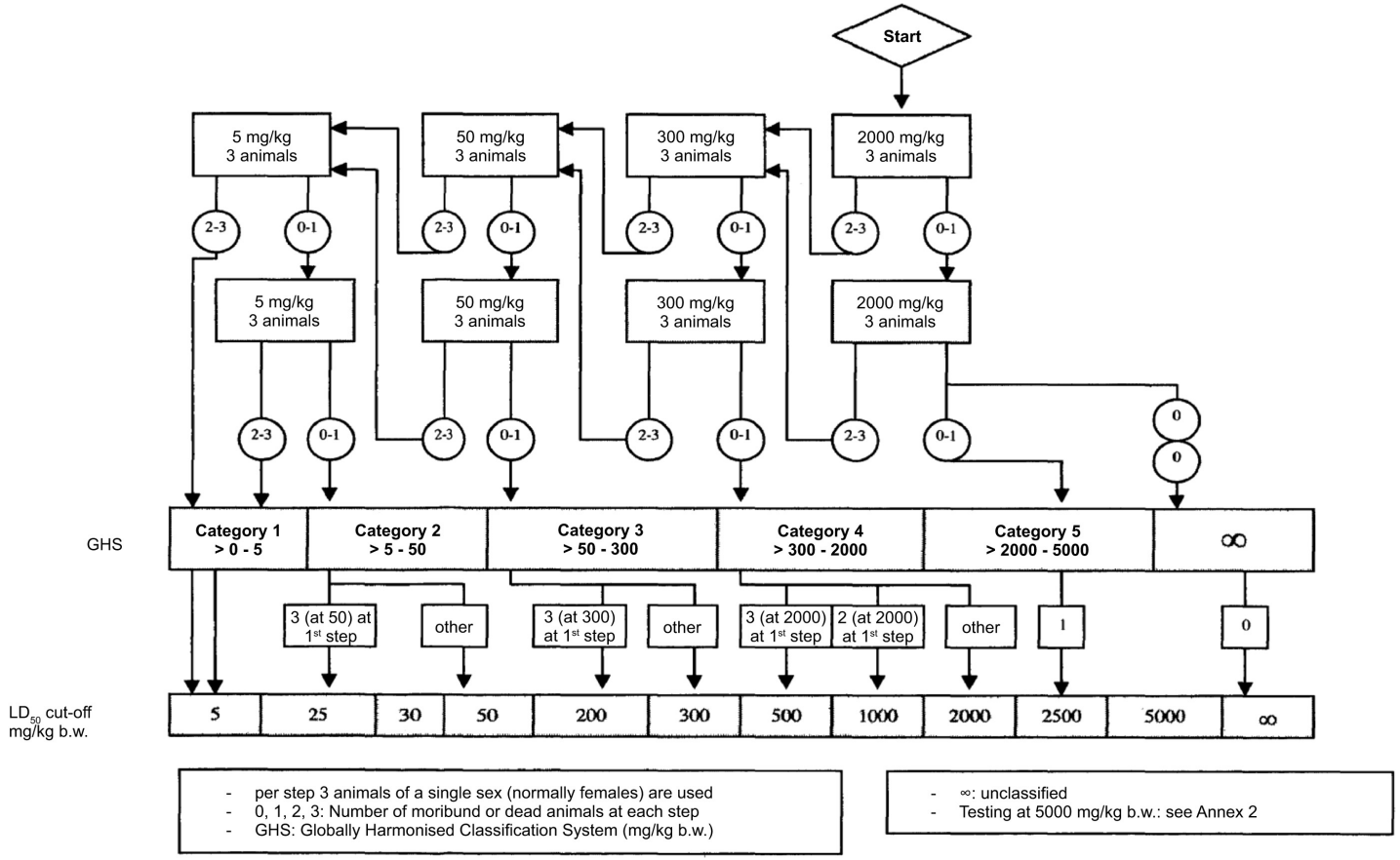
1C Lisa

KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 300 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



1d LISA

KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 2 000 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



▼B

2. LISA

KLASSIFITSEERIMISKRITEERIUMID SELLISTE KATSEAINETE KORRAL, MILLE OODATAVAD LD_{50} VÄÄRTUSED ÜLETAVAD 2 000 MG/KG JA MIDA EI OLE VAJA TESTIDA

Ohukategooriat 5 käsitlevad kriteeriumid on ette nähtud selliste katseainete identifitseerimiseks, mille korral on ägeda mürgisuse oht suhteliselt väike, kuid mis teatud tingimustel võivad ohustada tundlikke populatsioone. Nimetatud ainete korral on LD_{50} väärtused oodatavalt vahemikus 2 000–5 000 mg/kg suu- või nahakaudsel manustamisel või samaväärsete annustena muude manustamisviiside puhul. Katseaine võidakse klassifitseerida ohukategooriasse, mis on määratletud tingimusega: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (GHS 5. kategooria), järgmistel juhtudel:

a) kui on suunatud nimetatud kategooriasse lisades 1a–1d toodud katsete tegemise mis tahes katsekava poolt, mis põhineb surmajuhtumitel;

b) kui on juba olemas usaldusväärsed tõendid, mis näitavad, et LD_{50} väärtus asub 5. kategooriale vastavas vahemikus, või muud loomauuringud või toksilised mõjud inimestel osutavad sellele, et ainel on vahetu mõju inimese tervisele;

c) andmete ekstrapoleerimise, hindamise või mõõtmise alusel, kui määramine ohtlikumasse kategooriasse ei ole põhjendatud, ja

   — usaldusväärse teabe olemasolul oluliste toksiliste mõjude kohta inimestele või

   — kui täheldatakse suremust suukaudse manustamisega katsetes kuni 4. kategooriale vastavate väärtusteni või

   — kui eksperdiarvamus kinnitab mürgisuse olulisi kliinilisi tunnuseid katsetamisel kuni 4. kategooriale vastavate väärtusteni, välja arvatud kõhulahtisus, piloerektsioon või hoolitsemata välimus, või

   — kui eksperdiarvamus kinnitab usaldusväärset teavet võimalike märkimisväärsete ägedate mõjude kohta muude loomauuringute põhjal.

KATSETAMINE 2 000 MG/KG ÜLETAVATE ANNUSTEGA

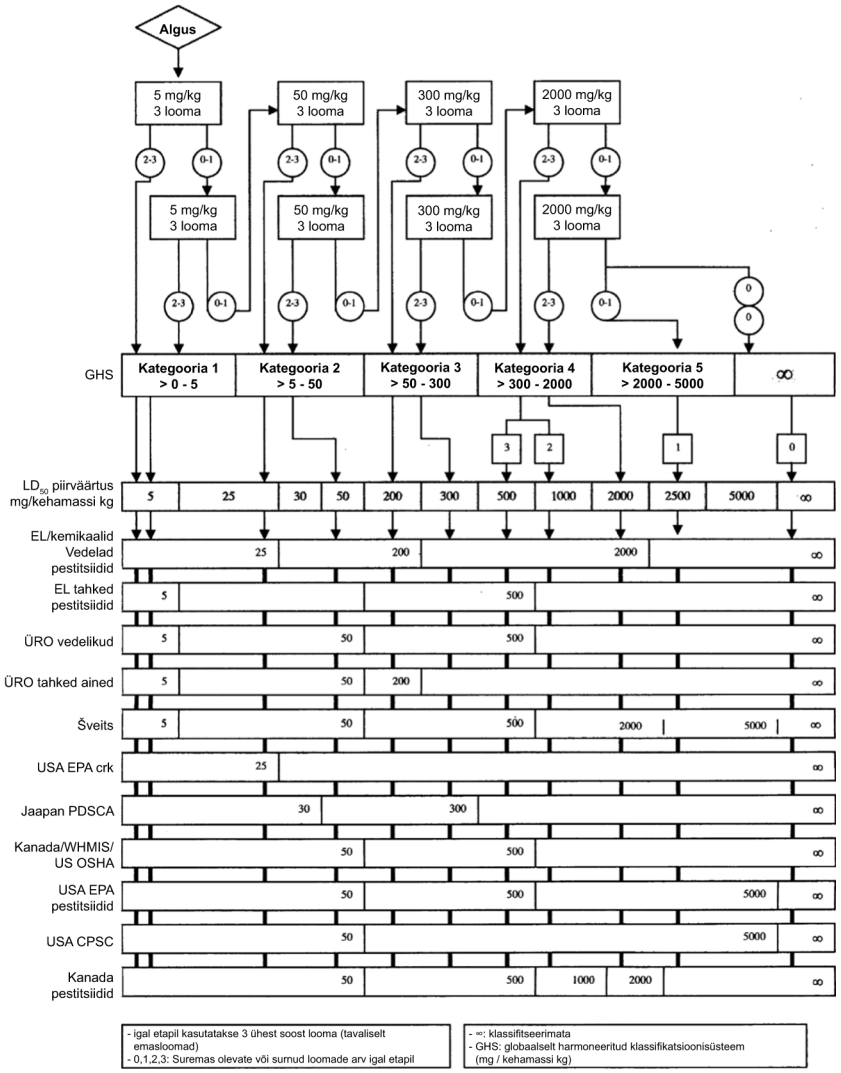
Tunnistades vajadust kaitsta loomade heaolu, ei kiideta heaks loomkatsete tegemist 5. kategooriale vastavas vahemikus (5 000 mg/kg annustega) ja seda kasutatakse üksnes siis, kui on suur tõenäosus, et sellise katse tulemused oleks otseselt seotud loomade või inimeste tervise kaitsega (10). Lisakatseid kõrgemate annusemääradega ei ole vaja teha.

Kui katse tegemine annusega 5 000 mg/kg on nõutav, vajatakse vaid ühte etappi (st kolme looma). Kui esimese annuse saanud loom sureb, jätkatakse 2 000 mg/kg doosi manustamist vastavalt 1. lisas toodud vooskeemidele. Kui esimene loom jääb ellu, manustatakse doos ka kahele järgmisele loomale. Kui sureb vaid üks kolmest loomast, siis ületab LD_{50} väärtus eeldatavalt 5 000 mg/kg. Kui mõlemad loomad surevad, jätkatakse manustamist annusega 2 000 mg/kg.

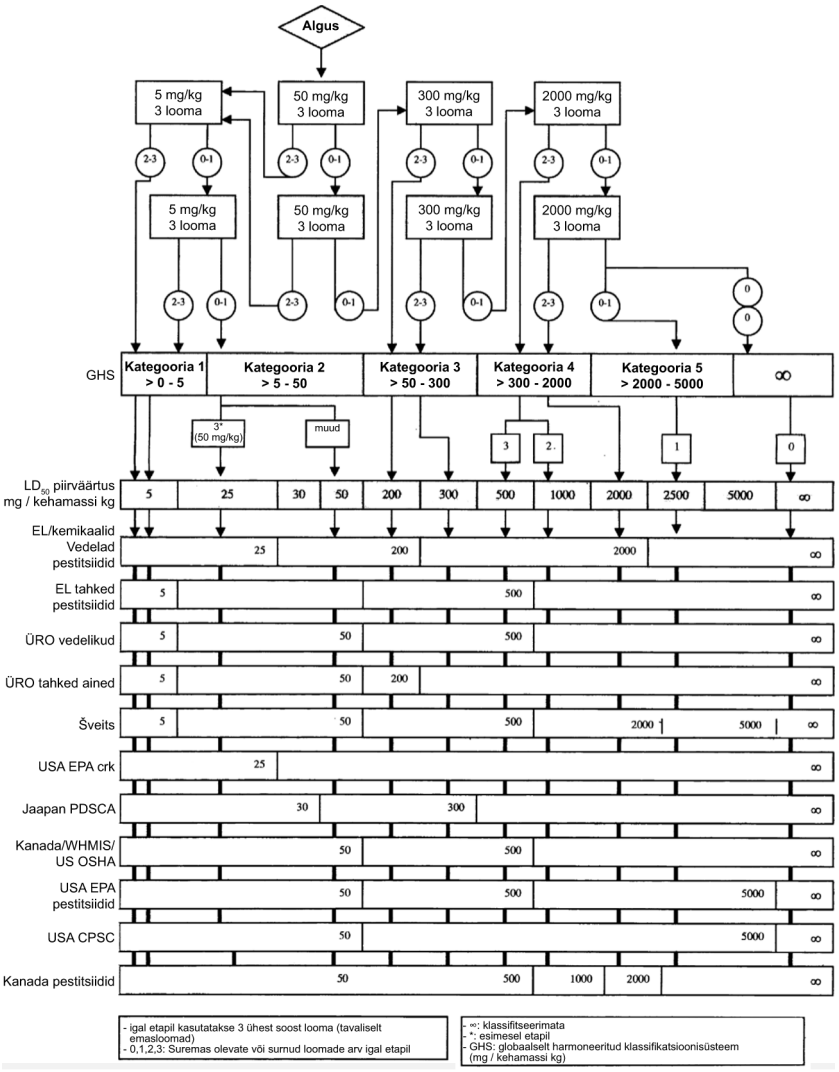
▼B

Lisa 3

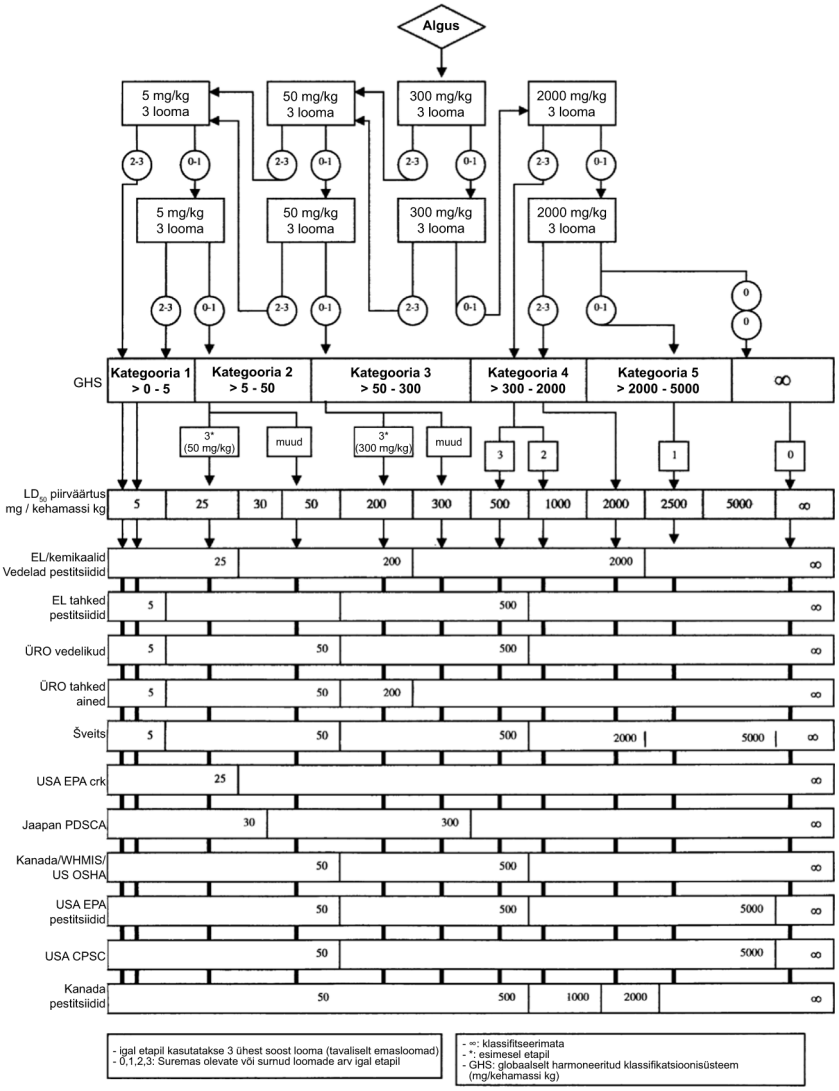
KATSEMEETOD B.1 b: EÜ süsteemi kohased klassifitseerimisjuhised, mida kasutatakse üleminekuperioodil kuni globaalselt harmoneeritud süsteemi (GHS) täieliku rakendamiseni (viite (8) alusel)



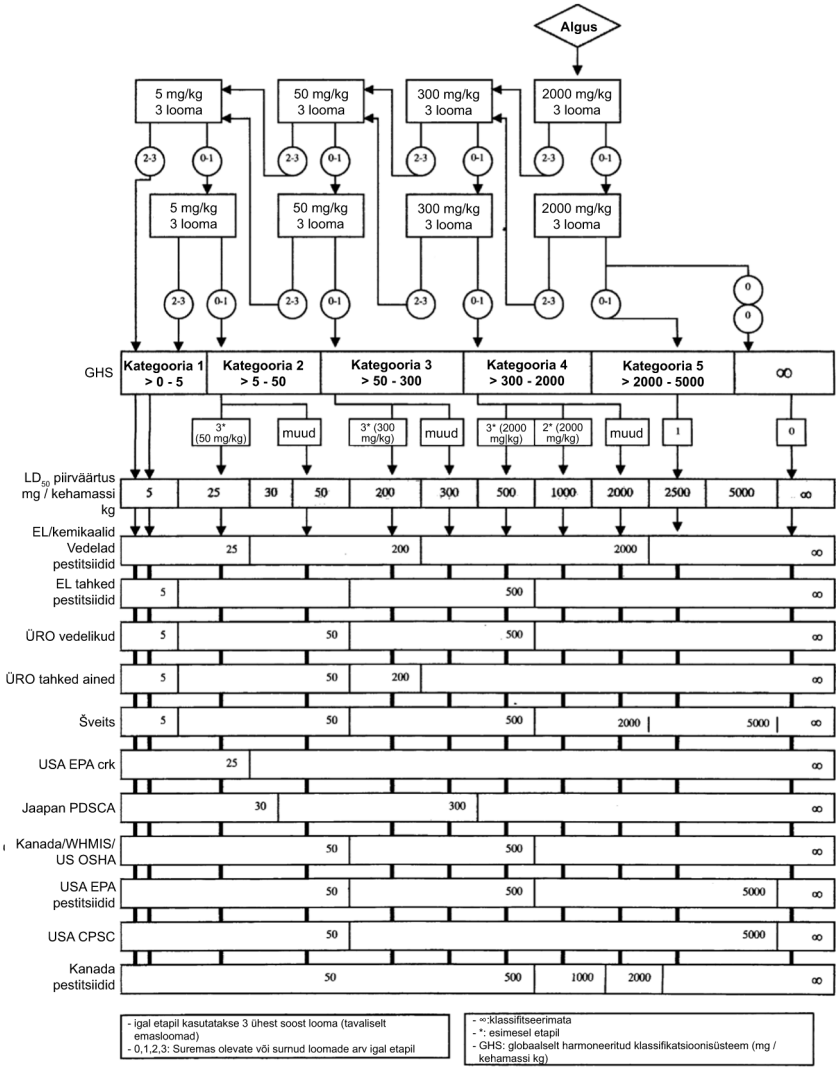
▼B


Algus
5 mg/kg 3 looma
50 mg/kg 3 looma
300 mg/kg 3 looma
2000 mg/kg 3 looma
2-3
0-1
0
GHS
Kategooria 1 > 0 - 5
Kategooria 2 > 5 - 50
Kategooria 3 > 50 - 300
Kategooria 4 > 300 - 2000
Kategooria 5 > 2000 - 5000
∞
3*
(50 mg/kg)
muud
3
2
1
0
LD50 piirväärtus mg / kehamassi kg
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EL/kemikaalid
Vedelad pestitsiidid
25 200 2000 ∞
EL tahked pestitsiidid
5 500 ∞
ÜRO vedelikud
5 50 500 ∞
ÜRO tahked ained
5 50 200 ∞
Šveits
5 50 500 2000 5000 ∞
USA EPA crk
25 ∞
Jaapan PDSCA
30 300 ∞
Kanada/WHMIS/ US OSHA
50 500 ∞
USA EPA pestitsiidid
50 500 5000 ∞
USA CPSC
50 5000 ∞
Kanada pestitsiidid
50 500 1000 2000 ∞
- igal etapil kasutatakse 3 ühest soost looma (tavaliselt emasloomad)
- 0,1,2,3: Suremas olevate või surnud loomade arv igal etapil
- ∞: klassifitseerimata
- *: esimesel etapil
- GHS: globaalselt harmoneeritud klassifikatsioonisüsteem (mg / kehamassi kg)

▼B


Algus
5 mg/kg 3 looma
50 mg/kg 3 looma
300 mg/kg 3 looma
2000 mg/kg 3 looma
2-3
0-1
0
GHS
Kategooria 1 > 0 - 5
Kategooria 2 > 5 - 50
Kategooria 3 > 50 - 300
Kategooria 4 > 300 - 2000
Kategooria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50 mg/kg)
muud
3* (300 mg/kg)
LD50 piirväärtus mg / kehamassi kg
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EL/kemikaalid Vedelad pestitsiidid
EL tahked pestitsiidid
ÜRO vedelikud
ÜRO tahked ained
Šveits
USA EPA crk
Jaapan PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
USA EPA pestitsiidid
USA CPSC
Kanada pestitsiidid
- igal etapil kasutatakse 3 ühest soost looma (tavaliselt emasloomad)
- 0,1,2,3: Suremas olevate või surnud loomade arv igal etapil
- ∞: klassifitseerimata
- *: esimesel etapil
- GHS: globaalselt harmoneeritud klassifikatsioonisüsteem (mg/kehamassi kg)

▼B


Algus
5 mg/kg 3 looma
50 mg/kg 3 looma
300 mg/kg 3 looma
2000 mg/kg 3 looma
2-3
0-1
0
GHS
Kategooria 1 > 0 - 5
Kategooria 2 > 5 - 50
Kategooria 3 > 50 - 300
Kategooria 4 > 300 - 2000
Kategooria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50 mg/kg)
muud
3* (300 mg/kg)
3* (2000 mg/kg)
2* (2000 mg/kg)
1
LD50 piirväärtus mg / kehamassi kg
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EL/kemikaalid
Vedelad pestitsiidid
EL tahked pestitsiidid
ÜRO vedelikud
ÜRO tahked ained
Šveits
USA EPA crk
Jaapan PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
USA EPA pestitsiidid
USA CPSC
Kanada pestitsiidid
- igal etapil kasutatakse 3 ühest soost looma (tavaliselt emasloomad)
- 0,1,2,3: Suremas olevate või surnud loomade arv igal etapil
- ∞:klassifitseerimata
- *: esimesel etapil
- GHS: globaalselt harmoneeritud klassifikatsioonisüsteem (mg / kehamassi kg)

▼M4

B.2. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 403 (2009) (1). Esialgne sissehingamisel avalduvat ägedat mürgisust käsitlev katsejuhend nr 403 võeti vastu 1981. aastal. Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.2 (mis on samaväärne katsejuhendi nr 403 läbivaadatud versiooniga) on koostatud suurema paindlikkuse tagamiseks, loomade kasutamise vähendamiseks ja regulatiivsete vajaduste täitmiseks. Läbivaadatud katsemeetod hõlmab kahte järgmist uuringu tüüpi: tavaline LC_{50} määramise eeskiri ja C × t (kontsentratsioon × aeg) määramise eeskiri. Käesoleva katsemeetodi peamised omadused on järgmised: meetod võimaldab määrata mõju sõltuvust kontsentratsioonist alates mitteletaalsest kuni letaalse mõjuni, et leida letaalne mediaankontsentratsioon (LC_{50}), mitteletaalse kontsentratsiooni läviväärtus (näiteks LC_{01}) ja kõvera tõus, ning määrata kindlaks mõju võimalik sõltuvus soost. C × t määramise eeskirja tuleks kasutada konkreetse regulatiivse või teadusliku vajaduse puhul, kui on vaja teha mitmesuguse kestusega loomkatsed, näiteks hädaolukorrale reageerimise kavandamiseks (nt akuutse kokkupuute näidistasemete (*Acute Exposure Guideline Levels*, AEGL) leidmine, hädaolukorras toimimise juhendite (*Emergency Response Planning Guidelines*, ERPG) kavandamine või akuutse kokkupuute läviväärtuste (*Acute Exposure Threshold Levels*, AETL) leidmine) või maakasutuse planeerimiseks.

2. Käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemise ja tõlgendamise juhendid on esitatud sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katse juhenddokumendis (juhenddokument nr 39) (2).

3. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 39 (2).

4. Käesolev katsemeetod võimaldab iseloomustada uuritavat kemikaali, hinnata kvantitatiivselt riski ning määruse (EÜ) nr 1272/2008 (3) kohaselt järjestada ja klassifitseerida uuritavat kemikaali. Juhenddokumendis nr 39 (2) on esitatud juhendid ägeda mürgisuse uurimiseks sobiva katsemeetodi valimiseks. Kui soovitakse saada ainult klassifitseerimiseks ja märgistamiseks vajalikku teavet, soovitatakse üldiselt kasutada käesoleva lisa peatükis B.52 esitatud meetodit (4) (vt juhenddokument nr 39 (2)). Käesolev katsemeetod B.2 ei ole spetsiaalselt ette nähtud erimaterjalide, nagu vähe lahustuvad isomeetrilised või kiudmaterjalid või toodetud nanomaterjalid, uurimiseks.

LÄHTEKAALUTLUSED

5. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, sh tehtud uuringud (näiteks käesoleva lisa peatükk B.52 (4)), mille andmete abil oleks võimalik täiendava katse tegemisest loobuda, et minimeerida loomade kasutust. Teave, mis võib aidata valida katseks kõige sobivama liigi, liini, soo, kokkupuuteviisi ja sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalis-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta (vt juhenddokument nr 39 (2)).

▼M4

6. Võimaluste piires tuleks vältida söövitava ja/või ärritava kemikaali katsetamist kontsentratsioonil, mis eeldatavasti põhjustab suurt valu ja/või kannatusi. Söövitava/ärritava mõju võimalust tuleks hinnata eksperdihindamise abil, kasutades selliseid tõendeid nagu inimeste kogemused ja varasemad loomkatsete andmed (näiteks korduvdoosi uuringutest, mis on tehtud mittesöövitava/-ärritava kontsentratsiooniga), olemasolevad *in vitro* andmed (näiteks käesoleva lisa peatükid B.40 (5) ja B.40a (6) või OECD katsejuhend nr 435 (7)), pH-väärtused, teave samalaadsete ainete kohta või iga muu asjakohane teave, et hinnata, kas täiendavast katsetamisest on võimalik loobuda. Konkreetse regulatiivse vajaduse jaoks (näiteks hädaolukorras tegutsemise kava koostamiseks) võidakse käesolevat katsemeetodit kasutada, et viia loomad kokkupuutesse kõnealuste materjalidega, kuna sellega saab uuringu juht või peamine uurija kontrollida sihtkontsentratsioonide valimise õigsust. Sihtkontsentratsioon ei tohiks siiski põhjustada tugevat ärritavat/söövitavat mõju, kuid peaks olema piisav, et pikendada kontsentratsiooni-mõju kõver tasemeni, millega saavutatakse katse regulatiivne ja teaduslik eesmärk. Kõnealused kontsentratsioonid tuleks valida juhtumipõhiselt ja seda valikut tuleks põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)).

KATSE PÕHIMÕTE

7. Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.2 on koostatud selleks, et saada piisavalt teavet uuritava kemikaali ägeda mürgisuse kohta, et kemikaal klassifitseerida ja saada letaalsuse andmed (näiteks $LC_{50,}$ LC_{01} ja kõvera tõus) ühe või mõlema soo kohta, mida vajatakse riski kvantitatiivseks hindamiseks. Käesolev katsemeetod hõlmab kahte meetodit. Esimene meetod on tavaline määramiseeskiri, mille puhul loomade rühmad viiakse kokkupuutesse piirkontsentratsiooniga (piirsisalduskatse) või astmeliselt mitme eri kontsentratsiooniga eelnevalt kindlaks määratud aja jooksul, mis tavaliselt on neli tundi. Konkreetse regulatiivse eesmärgi jaoks võib kasutada muid kokkupuute ajavahemikke. Teine meetod on C × t määramise eeskiri, mille puhul loomade rühmad viiakse kokkupuutesse ühe (piir)kontsentratsiooniga või mitme eri kontsentratsiooniga mitme ajavahemiku jooksul.

8. Suremas loomad või loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad raskete ja kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata; selliseid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhised prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 19 (8).

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

9. Tuleks kasutada katseloomade enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud isendeid. Eelistatav loomaliik on rott; muude liikide kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

Loomade ettevalmistamine

10. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kokkupuute päeval peaksid loomad olema 8 kuni 12 nädala vanused noored täiskasvanud, kelle kehamass ei tohiks erineda rohkem kui ±20 % selliste samas vanuses ja samast soost loomade keskmisest kehamassist, keda kasutati varasemates kemikaaliga kokkupuute katsetes. Loomad valitakse juhuslikult ja märgistatakse individuaalselt. Loomi hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda. Loomad peaksid olema enne katset ka katseseadmetega lühikese aja vältel kohanenud, kuna sel viisil vähendatakse uude keskkonda viimisest põhjustatud stressi.

▼M4

Pidamistingimused

11. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandeainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuude toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele ülearuseid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise minutimahtu. Kui kättesaadavad on üldandmed, mille kohaselt kõnealuseid muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, siis ei ole eelnev hoiutoruga kohanemine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokku puutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisöötasid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatus koguses kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

Inhalatsioonikambrid

12. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärki. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu erieesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuude kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhenddokumendis nr 39 (2).

KOKKUPUUTETINGIMUSED

Kontsentratsioonide manustamine

13. Kokkupuude ainult nina kaudu võib rottidel kesta kuni kuus tundi. Kui hiirtel kasutatakse ainult nina kaudu kokkupuudet, siis ei tohiks kokkupuude tavaliselt ületada nelja tundi. Kui vajatakse pikema kestusega uuringuid, siis tuleks seda põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kogukehakambris aerosoolidega kokku puutuvad loomad tuleks eraldi paigutada, et vältida puurikaaslaste karvkatte korrastamise tõttu uuritava kemikaali suukaudset manustamist. Kokkupuute ajal ei tohiks loomi sööta. Loomadele võib kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal vett anda.

14. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsikalisest vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügroskoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist.

▼M4

Osakeste jaotus suuruse järgi

15. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosoole, mille osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–4 μm ning geomeetriline standardhälve (σ_g) on 1,5–3,0 (2, 9, 10). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdihinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed võivad olla kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed, kiud ja hügroskoopsed materjalid (mille suurus hingamisteede niiskes keskkonnas suureneb) võivad olla suuremad.

Uuritava kemikaali preparaat kandeaines

16. Selleks et tagada uuritava kemikaali vajalik kontsentratsioon õhus ja osakeste suurus, võib olla vaja kasutada kandeainet. Eelistatult tuleks kasutada vett. Aineosakesi võib töödelda mehaaniliselt, et saavutada osakeste soovitud suurusjaotus, kuid tuleks olla hoolikas, et uuritavat kemikaali mitte lagundada ega muuta. Kui mehaaniline töötlus (näiteks tugeval jahvatamisel hõõrdumisest tekkinud kõrge temperatuur) võib olla uuritava kemikaali koostist muutnud, siis tuleks uuritava kemikaali koostist analüüsiga kontrollida. Tuleks olla hoolikas, et vältida uuritava kemikaali saastamist. Ei ole vaja katsetada raskesti peenestuvat teralist materjali, mis on sihipäraselt valmistatud nii, et seda ei saa sisse hingata. Materjali hõõrumisega tuleks tõendada, et teralise materjali käsitsemisel ei teki sissehingatavaid osakesi. Kui hõõrumiskatsel tekib sissehingatavaid osakesi, tuleks teha sissehingamisel mürgisust näitav katse.

Loomade kontrollrühm

17. Samaaegne negatiivne (puhtas õhus peetavate) loomade kontrollrühm ei ole vajalik. Kui katsekeskkonna loomiseks kasutatakse muud kandeainet kui vesi, siis tuleks kandeaine kontrollrühma kasutada ainult juhul, kui varasemad sissehingamisel avalduva mürgisuse andmed ei ole kättesaadavad. Kui kandeaines sisalduva uuritava kemikaali mürgisuse uuringuga mürgisust ei leita, siis võib järeldada, et kandeaine ei ole katsetatud kontsentratsioonil mürgine, seega ei ole kandeaine kontrollrühm vajalik.

KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE

Kambri õhuvarustus

18. Igas kokkupuutekatses tuleks kambri õhuvarustust hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed vähemalt kord tunnis registreerida. Keskkonnas oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (või selle stabiilsuse) seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit keskkonna tekitamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Eraldi tuleks jälgida, et ainult nina kaudu kokkupuute uurimise kambris ei hingataks väljahingatud õhku uuesti sisse, kuna kokkupuutesüsteemi õhuvarustus ei ole piisav uuritavat kemikaali sisaldava õhu dünaamilise voo tagamiseks. On olemas metoodika, mille abil saab tõendada, et valitud katsetingimustes ei hingata väljahingatud õhku uuesti sisse (2, 11). Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid nõudeid ei ole võimalik täita, siis tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisisaldust mõõta.

▼M4

Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus

19. Kambri temperatuuri tuleks hoida 22 ± 3 °C juures. Loomade hingamistsooni suhtelist õhuniiskust tuleks nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu kokkupuute katsetes seirata ja registreerida vähemalt kolm korda kuni neljatunnise katse jooksul ning iga tund lühema katse puhul. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu (näiteks veepõhise segu uurimisel) ei pruugi see olla saavutatav või mõõdetav.

Uuritav kemikaal: nimikontsentratsioon

20. Kui see on võimalik, siis tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambrisüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katsesüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

Uuritav kemikaal: tegelik kontsentratsioon

21. Tegelik kontsentratsioon on inhalatsioonikambris loomade hingamistsoonist võetud proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik määrata spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni- või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetriline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vähelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud konkreetse kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilist analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutuda vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelistatult lenduvas olekus) kordusanalüüse korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase. Katseprotokollis tuleks esitada siht-, nimi- ja tegelikud kontsentratsioonid, kuid letaalse kontsentratsiooni arvutamiseks kasutatakse statistilises analüüsis ainult tegelikke kontsentratsioone.

22. Võimaluse korral tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsidest või muud hinnangud. Kuigi uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määratlemise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).

23. Kokkupuutekeskkonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna ja seiratakse pidevalt ja/või pisteliselt, olenevalt analüüsimeetodist. Kui kasutatakse pistelist proovivõttu, tuleks neljatunnise uuringu vältel võtta kambrikeskkonnast proove vähemalt kaks korda. Kui see ei ole piiratud õhuvarustuse või väikeste kontsentratsioonide tõttu võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Kui proovide analüüsimisel saadakse oluliselt erinevad tulemused, tuleks järgmiste uuritavate kontsentratsioonide puhul

▼M4

võtta kokkupuute kohta neli proovi. Kambrist võetud proovide üksikud kontsentratsioonid ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui ±10 % gaaside ja aurude puhul või ±20 % vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg (t_{95}) ja see registreerida. Kokkupuute kestus on aeg, mille vältel lisatakse uuritavat kemikaali ja seejuures arvestatakse t_{95} saavutamiseks vajalikku ajavahemikku. Juhendid t_{95} hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

24. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskkonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoode või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambris erinevalt, nii et tuleks valida vähemalt üks uuritav aine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, siis tuleks kirja panna segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

Uuritav kemikaal: osakeste suurusjaotus

25. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt kaks korda iga neljatunnise kokkupuute ajal, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada teist seadet, näiteks gravimeetrilist filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kui uuringu varajases etapis on võimalik tõendada võrdväärsust, siis võib loobuda täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katsest ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik kokkupuudet korrata. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool või kui auru keskkonnas tuvastatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga (vt punkt 15).

KATSE KÄIK

26. Allpool on kirjeldatud kahte järgmist uuringutüüpi: tavaline määramiseeskiri ja C × t määramise eeskiri. Mõlemad eeskirjad võivad hõlmata eeluuringut, põhiuuringut ja/või piirsisalduskatset (tavaline määramiseeskiri) või katsetamist piirkontsentratsiooni juures (C × t). Kui mõju on teadaolevalt suurem ühele soole, võib uuringu juht otsustada, et uuringus kasutatakse ainult tundlikuma soo isendeid. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseliigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Enne alustamist tuleks loomade kasutamise minimeerimiseks võtta arvesse kõik kättesaadavad andmed. Näiteks käesoleva lisa peatüki B.52 (4) kohaselt saadud andmed võivad muuta eeluuringu tarbetuks ja näidata, kas mõju sõltub looma soost (vt juhenddokument nr 39 (2)).

▼M4

TAVALINE MÄÄRAMISEESKIRI

Üldised põhimõtted: tavaline määramiseeskiri

27. Tavalise uuringu puhul viiakse loomarühmad kokkupuutesse uuritava kemikaaliga kindla ajavahemiku jooksul (tavaliselt neli tundi) kas ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldavas või kogukehakambris. Loomad viiakse kokkupuutesse kas piirkontsentratsiooniga (piirsisalduskatse) või vähemalt kolme kontsentratsiooniga astmelises protseduuris (põhiuuring). Põhiuuringule võib eelneda eeluuring, v.a juhul, kui uuritava kemikaali kohta on mingil määral teavet juba olemas, näiteks eelnevalt tehtud uuring B.52 (vt juhenddokument nr 39 (2)).

Eeluuring: tavaline määramiseeskiri

28. Eeluuringut kasutatakse uuritava kemikaali mõju prognoosimiseks, mõju sooliste erinevuste kindlaksmääramiseks ning põhiuuringu või piirsisalduskatse jaoks kokkupuute kontsentratsioonide valimisel abistamiseks. Eeluuringu kontsentratsioonide valimisel tuleks kasutada kogu kättesaadavat teavet, sh olemasolevaid (kvantitatiivse) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuse ((Q)SAR) andmeid ja andmeid samalaadsete kemikaalide kohta. Iga kontsentratsiooniga ei tohiks puutuda kokku rohkem kui kolm isast ja kolm emast isendit (soolise erinevuse kindlaksmääramiseks võidakse vajada kolme looma kummagi soo kohta). Eeluuringus võib kasutada ühte kontsentratsiooni, aga vajaduse korral võib kasutada ka rohkem kui ühte kontsentratsiooni. Eeluuringus ei tuleks katsetada nii palju loomi ja kontsentratsioone, et see sarnaneks juba põhiuuringuga. Eeluuringu asemel võib kasutada varem tehtud uuringut B.52 (4) (vt juhenddokument nr 39 (2)).

Piirsisalduskatse: tavaline määramiseeskiri

29. Piirsisalduskatset kasutatakse, kui uuritav kemikaal ei ole teadaolevalt või eeldatavalt mürgine, s.o mürgistus tekib ainult regulatiivse piirkontsentratsiooni ületamise puhul. Piirsisalduskatses viiakse uuritava kemikaaliga piirkontsentratsiooni juures kokkupuutesse üks kolmest isasest ja kolmest emasest koosnev loomarühm. Teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta võib saada varem katsetatud samalaadseid kemikaale käsitlevatest andmetest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisainete keemilist laadi ja sisaldust. Kui teavet mürgisuse kohta on vähe või ei ole üldse või kui uuritav kemikaal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse.

30. Piirkontsentratsiooni valimine sõltub tavaliselt regulatiivsetest nõuetest. Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, on gaasi, auru ja aerosooli piirkontsentratsioon vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (või suurim saavutatav kontsentratsioon) (3). Mõne uuritava kemikaali, eelkõige auru või aerosooli piirkontsentratsiooni saavutamine võib olla tehniliselt keeruline. Aerosooli katsetamisel peaks olema peamine eesmärk saavutada sissehingamiseks sobiv osakeste suurus (MMAD 1–4 μm). See on enamiku uuritavate kemikaalide puhul võimalik kontsentratsioonil 2 mg/l. Aerosooli katsetamist rohkem kui 2 mg/l juures tuleks proovida ainult juhul, kui on võimalik saavutada sissehingamiseks sobiv osakeste suurus (vt juhenddokument nr 39 (2)). Määruses (EÜ) nr 1272/2008 ei soovitata loomade heaolu kaalutlustel kasutada katses piirkontsentratsiooni ületavat kontsentratsiooni (3). Piirkontsentratsiooni kasutamist tuleks kaaluda ainult siis, kui on suur tõenäosus, et kõnealuse katse tulemustest võib otseselt sõltuda inimeste tervise kaitse (3), ja seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Plahvatusohtliku uuritava kemikaali puhul tuleks olla hoolikas, et vältida plahvatust võimaldavaid tingimusi. Loomade tarbetu kasutamise vältimiseks tuleks enne piirsisalduskatset teha proovikatse ilma loomadeta, et tagada piirsisalduskatse jaoks vajalike kambritingimuste saavutamine.

▼M4

31. Kui piirkontsentratsiooni juures täheldatakse, et loomad surevad või on suremas, siis võib piirsisalduskatse tulemusi kasutada eeluuringuna muudel kontsentratsioonidel edasiseks katsetamiseks (vt põhiuuring). Kui uuritava kemikaali füüsikalised või keemilised omadused muudavad piirkontsentratsiooni saavutamise võimatuks, siis tuleks katsetada suurimat saavutatavat kontsentratsiooni. Kui suurim saavutatav kontsentratsioon põhjustab alla 50 % suremuse, siis ei ole edasine katsetamine vajalik. Kui piirkontsentratsiooni ei ole võimalik saavutada, siis tuleks katseprotokollis esitada selgitus ja täiendavad andmed. Kui auruga saavutatav suurim kontsentratsioon ei ole mürgine, siis võib olla vajalik lisada uuritavat kemikaali vedelikaerosoolina.

Põhiuuring: tavaline määramiseeskiri

32. Põhiuuring tehakse tavaliselt vähemalt kolme kontsentratsiooniga, kasutades viit isas- ja viit emaslooma (või kui on teada, kummast soost isendid on tundlikumad, siis viit sellest soost looma) igal kontsentratsioonil. Usaldusväärse statistilise analüüsi tagamiseks tuleks kasutada piisavalt suuri kontsentratsioone. Ajavahemik katserühmade kokkupuutekatsete vahel määratakse kindlaks mürgistusnähtude alguse, kestuse ja raskuse järgi. Loomade kokkupuude järgmise kontsentratsiooniga tuleks edasi lükata seni, kuni eelmises katses kasutatud loomade ellujäämises võib olla mõistlikkuse piires veendunud. See võimaldab uuringu juhil kohandada järgmise kokkupuuterühma sihtkontsentratsiooni. Kuna katses kasutatakse keerukat tehnoloogiat, ei pruugi see inhalatsiooniuuringute puhul alati olla praktiline. Sellisel juhul peaks loomade kokkupuude järgmise kontsentratsiooniga põhinema varasemal kogemusel ja teaduslikul hinnangul. Segu katsetamisel tuleks tugineda juhenddokumendile nr 39 (2).

C × T (KONTSENTRATSIOON × AEG) MÄÄRAMISE EESKIRI

Üldised põhimõtted: C × t määramise eeskiri

33. Sissehingamisel avalduva mürgisuse hindamisel võidakse tavalise määramiseeskirja alternatiivina kaaluda astmelist C × t määramise eeskirja (12, 13, 14). Selle lähenemisviisi puhul võivad loomad puutuda uuritava kemikaaliga kokku mitmel kontsentratsioonil ja mitme ajavahemiku vältel. Kõik katsed tehakse ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldavas kambris (kogukehakambrid ei ole selle määramiseeskirja jaoks praktilised). Seda eeskirja on kirjeldatud 1. liite toimimisskeemiga. Simulatsioonianalüüsiga on näidatud, et tavaline määramiseeskiri ja C × t määramise eeskiri võivad mõlemad anda kindlaid LC_{50} väärtusi, kuid C × t määramise eeskiri annab tavaliselt kindlamaid LC_{01} ja LC_{10} väärtusi (15).

34. Simulatsioonianalüüs on näidanud, et C × t intervalli kohta kahe looma kasutamine (üks loom kummastki soost mõlema soo kasutamise korral või kaks looma sellest soost, kummale on suurem mõju) võib tavaliselt olla piisav põhiuuringus nelja kontsentratsiooni ja viie kokkupuute ajavahemiku katsetamise korral. Mõnel juhul võib uuringu juht otsustada kasutada kummagi soo puhul kahte rotti C × t intervalli kohta (15). Kummastki soost kahe looma kasutamine kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta võib vähendada andmete kallutatust ja hinnangute hajumist, suurendada ennustuste täpsust ja hälvete kirjeldatavust usaldusvahemikuga. Kui andmete kooskõla ei ole hindamiseks piisav (kui kasutatakse ühte looma kummastki soost või kahte looma soost, millele on suurem mõju), siis võib piisata viienda kokkupuutekontsentratsiooni kasutamisest. Täiendavad juhendid C × t uuringus kasutatavate loomade arvu ja kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

▼M4

Eeluuring: C × t määramise eeskiri

35. Uuritava kemikaali mõju hindamiseks ja põhiuuringu kokkupuutekontsentratsioonide valimiseks kasutatakse eeluuringut. Vajalik võib olla eeluuring, milles kasutatakse kuni kolme looma soo ja kontsentratsiooni kohta (vt lähemalt juhenddokumendi nr 39 (2) III liide), et valida põhiuuringu jaoks sobiv algkontsentratsioon ja minimeerida kasutatavate loomade arvu. Soolise erinevuse kindlaksmääramiseks võib olla vajalik kasutada kolme looma soo kohta. Need loomad peaksid puutuma ainega kokku katse ühe ajavahemiku jooksul, tavaliselt 240 minutit. Asjakohaste katsekeskkondade loomise võimalikkust tuleks hinnata ilma loomadeta tehtavate tehniliste proovikatsete ajal. Eeluuringu tegemine ei ole tavaliselt vajalik, kui suremuse andmed on kättesaadavad B.52 kohasest uuringust (4). B.2 kohase uuringu lähtesihtkontsentratsiooni valides peaks uuringu juht arvesse võtma kõiki olemasolevaid B.52 kohastes uuringutes (4) mõlema soo ja kõigi katsetatud kontsentratsioonide kohta saadud suremuse andmeid (vt juhenddokument nr 39 (2)).

Lähtekontsentratsioon: C × t määramise eeskiri

36. Lähtekontsentratsioon (I kokkupuude) (1. liide) on kas piirkontsentratsioon või uuringu juhi poolt eeluuringu alusel valitud kontsentratsioon. Kahest loomast (üks kummagi soo kohta) koosnevad rühmad viiakse kokkupuutesse kõnealuse kontsentratsiooniga mitme ajavahemiku vältel (näiteks 15, 30, 60, 120 või 240 minutit), mis teeb kokku kümme looma (I kokkupuude) (1. liide).

37. Piirkontsentratsiooni valimine sõltub tavaliselt regulatiivsetest nõuetest. Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, on gaaside, aurude ja aerosoolide piirkontsentratsioonid vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (või suurim saavutatav kontsentratsioon) (3). Mõne uuritava kemikaali, eelkõige auru või aerosooli piirkontsentratsiooni tekitamine võib olla tehniliselt keeruline. Aerosooli katsetamisel peaks eesmärk olema saavutada sissehingamiseks sobiv osakeste suurus (st MMAD 1–4 μm) piirkontsentratsioonil 2 mg/l. See on enamiku uuritavate kemikaalide puhul võimalik. Aerosooli katsetamist rohkem kui 2 mg/l juures tuleks proovida ainult juhul, kui sissehingamiseks sobiv osakeste suurus on võimalik saavutada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Määruses (EÜ) nr 1272/2008 ei soovitata loomade heaolu kaalutlustel piirkontsentratsiooni ületava kontsentratsiooniga katsetamist (3). Piirkontsentratsiooni ületava kontsentratsiooni katsetamist tuleks kaaluda ainult juhul, kui on suur tõenäosus, et kõnealuse katse tulemustel on otsene mõju inimeste tervise kaitsele (3), ja katseprotokollis tuleks seda põhjendada. Plahvatusohtliku uuritava kemikaali puhul tuleks olla hoolikas, et vältida plahvatust võimaldavaid tingimusi. Loomade ebavajaliku kasutamise vältimiseks tuleks enne katset lähtekontsentratsiooniga teha proovikatse ilma loomadeta, et tagada kõnealuse kontsentratsiooni jaoks vajalike kambritingimuste saavutatavus.

38. Kui lähtekontsentratsiooni juures täheldatakse, et loomad surevad või on suremas, võib kõnealuse kontsentratsiooniga saadud tulemusi kasutada lähtepunktina edasiseks katsetamiseks muude kontsentratsioonidega (vt põhiuuring). Kui uuritava kemikaali füüsikalised või keemilised omadused muudavad piirkontsentratsiooni saavutamise võimatuks, tuleks katsetada suurimat saavutatavat kontsentratsiooni. Kui suurim saavutatav kontsentratsioon põhjustab alla 50 % suremuse, ei ole edasine katsetamine vajalik. Kui piirkontsentratsiooni ei ole võimalik saavutada, tuleks katseprotokollis esitada selgitus ja seda toetavad andmed. Kui auru suurim saavutatav kontsentratsioon ei ole mürgine, siis võib olla vajalik lisada uuritavat kemikaali vedelikaerosoolina.

▼M4

Põhiuuring: C × t määramise eeskiri

39. Põhiuuringus katsetatav lähtekontsentratsioon (I kokkupuude) (1. liide) on kas piirkontsentratsioon või uuringu juhi poolt eeluuringu alusel valitud kontsentratsioon. Kui I kokkupuute ajal või selle järel täheldatakse loomade suremist, võetakse suremist põhjustav minimaalne kokkupuude (C × t) aluseks II kokkupuute kontsentratsiooni ja ajavahemike kindlaksmääramisel. Iga edasine kokkupuude oleneb eelnevast kokkupuutest (vt 1. liide).

40. Paljude uuritavate kemikaalide puhul on lähtekontsentratsiooniga saadud tulemused koos kolme lühema täiendava kokkupuutega (kokkupuute ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille järjestikuste ajavahemike erinevust näitab progressiooni kordaja, tavaliselt √2) piisav C × t suremuse suhte kindlaksmääramiseks (15), kuid otstarbekas võib olla viienda kokkupuutekontsentratsiooni kasutamine (vt 1. liide ja juhenddokument nr 39 (2)). C × t protokolli tulemuste matemaatiline käsitlus on esitatud 1. liites.

VAATLUSED

41. Loomi tuleks kokkupuute ajal sageli kliiniliselt jälgida. Pärast kokkupuudet tuleks kliinilised vaatlused korraldada vähemalt kaks korda kokkupuutepäeva jooksul või, kui loomade reageerimine kokkupuutele seda nõuab, ka sagedamini, ja seejärel vähemalt kord päevas kokku 14 päeva jooksul. Vaatlemise ajavahemiku kestus ei ole kindlaks määratud; see tuleks määrata kliiniliste nähtude laadi, tekkimisaja ja taastumisperioodi pikkuse alusel. Mürgistusnähtude ilmumise ja kadumise aeg on oluline eelkõige juhul, kui mürgistusnähtudel on kalduvus avalduda viitmõjuna. Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed. Suremas olevad loomad ja loomad, kellel esinevad tugeva valu ja/või püsivad suurte kannatuste tunnused, tuleks loomade heaolu kaalutlustel humaansel viisil surmata. Mürgistuse kliiniliste nähtude vaatluste tegemisel tuleks olla hoolikas, et mitte pidada kokkupuutekatsest põhjustatud esialgset kehva välimust ja ajutisi hingamismuutusi uuritava kemikaaliga seotud mürgistuseks, mis nõuaks loomade enneaegset surmamist. Tuleks võtta arvesse humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (nr 19) esitatud põhimõtteid ja kriteeriume (7). Kui loomad surmatakse humaansetel kaalutlustel või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

42. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, hingamise, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Võimaluse korral tuleks eristada lokaalset ja süsteemset mõju ja need registreerida. Tuleb pöörata tähelepanu värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma esinemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega.

Kehamass

43. Iga looma kehamass tuleks registreerida üks kord kohanemise perioodi vältel, kokkupuute päeval enne kokkupuudet (päev 0) ning vähemalt päevadel 1, 3 ja 7 (ning seejärel iga nädal) ja surma või eutanaasia korral, kui see toimub pärast päeva 1. Kehamass on teatavasti mürgistuse oluline näitaja ja seega tuleks täpselt jälgida loomi, kelle kehamass väheneb püsivalt ≥ 20 % võrreldes uuringueelsete näitajatega. Ellujäänud loomad kaalutakse ja surmatakse humaansel viisil kokkupuutejärgsel ajavahemikul.

▼M4

Patoloogia

44. Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kes surmati eutanaasiaga või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse täielikult. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritähelepanu hingamisteede mis tahes muutustele.

45. Uuringu tõlgendusväärtuse laiendamiseks võidakse kaaluda kavandis eelnevalt ette nähtud täiendavaid uuringuid, näiteks ellujäänud rottide kopsude massi mõõtmine ja/või hingamisteede ärrituse tõendamine hingamisteede mikroskoobiga vaatlemise alusel. Uurida võib ka organeid, milles 24 tundi või kauem elanud loomadel esineb patoloogilisi muutusi, samuti organeid, mis teadaolevalt või eeldatavasti võivad olla kahjustatud. Kogu hingamistee mikroskoobiuuring võib anda kasulikku teavet veega reageeriva uuritava kemikaali, näiteks happe või hügroskoopse kemikaali kohta.

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

46. Tuleks esitada andmed iga üksiku looma kehamassi ja lahkamistulemuste kohta. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguleiud.

Katseprotokoll

47. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseloomad ja pidamistingimused

— Puuritingimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline niiskus, valgustusperiood ja sööt.

— Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus.

— Loomade arv, vanus ja sugu.

— Randomiseerimismeetod.

— Sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/päritolu, vee päritolu).

— Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

▼M4

Uuritav kemikaal

— Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).

— Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

Kandeaine

— Kandeaine kasutamise põhjendus ja valiku põhjendus (kui kandeainena ei kasutata vett).

— Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

Inhalatsioonikamber

— Inhalatsioonikambri, sh selle mõõtmete ja mahu kirjeldus.

— Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.

— Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.

— Õhuallikas ja kambrisse suunatud / kambrist välja lastud õhu töötlemine ning konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.

— Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kaliibrimisel kasutatud meetodid.

— Rõhuerinevus (positiivne või negatiivne).

— Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine süsteemis (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Katsekeskkonna ajaline homogeensus/stabiilsus.

— Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonnast proovide võtmine kambris.

— Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuutepordi kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Teave hapniku ja süsinikdioksiidi sisalduse mõõtmiseks kasutatud seadmete kohta, vajaduse korral.

— Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg (t_{95}).

— Kogu kambris oleva õhu vahetuste arv tunnis.

— Mõõteseadmed (vajaduse korral).

Andmed kokkupuute kohta

— Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.

— Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambrisse suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).

— Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsoonist kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse iga faasi eraldi analüüsida.

▼**M4**

— Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikutes (näiteks mg/l, mg/m^3 jne); sulgudes võib lisada ka ruumalaühikud (näiteks ppm, ppb jne).

— Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetriline standardhälve (σ_g) ning nende arvutamise meetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

Katsetingimused

— Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed mis tahes meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks. Kui mehaanilised protsessid võivad olla muutnud uuritava kemikaali koostist, tuleb lisada nende analüüside tulemused, mille abil kontrolliti uuritava kemikaali koostist.

— Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).

— Andmed kasutatud keemilise analüüsi meetodi kohta ja meetodi valideerimise kohta (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsil).

— Katsekontsentratsioonide valiku põhjendus.

Tulemused

— Tabelid katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.

— Tabelid kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni andmete kohta.

— Tabelid osakeste suurusjaotuse kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja σ_g arvutamine.

— Tabelid iga looma reageerimise ja kontsentratsioonide kohta (st mürgistusnähtudega loomad, kaasa arvatud surnud loomad, mõjude laad, raskus, ilmumise aeg ja mõju kestus).

— Uuringul registreeritud konkreetse looma kehamass; surmakuupäev ja -aeg, kui loom sureb enne plaanijärgset eutanaasiat, mürgistusnähtude tekke aeg ja pöörduvus konkreetse looma puhul.

— Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

— Suremuse hinnangud (näiteks LC_{50}, LD_{01}), sh 95 % usalduspiirid ja kõvera tõus (kui see hindamismeetodi alusel esitatakse).

— Statistiline seos, sh eksponendi n hinnang ($C \times t$ määramise eeskiri). Tuleks esitada kasutatud statistikatarkvara nimetus.

▼M4

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine

— Eritähelepanu tuleks pöörata nende meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.

— Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda osakeste sissehingamiseks sobivat suurust, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.

— Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (8) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaansel viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.

— Kui katsetamine käesoleva lisa peatüki B.52 (4) alusel katkestati käesoleva katsemeetodi B.2 rakendamiseks, siis tuleks seda põhjendada.

— Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõlalisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.

— Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).

KIRJANDUS

1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/testguidelines.

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/testguidelines.

3) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

4) Käesoleva lisa peatükk B.52 „Äge mürgisus sissehingamisel – ägeda mürgisuse klassi määramise meetod”.

5) Käesoleva lisa peatükk B.40 „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmine”.

6) Käesoleva lisa peatükk B.40a „Nahasöövituskatse *in vitro*: katse inimnaha mudeliga”.

7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/testguidelines.

9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321–327.

10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278–290.

13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105–117.

14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65–71.

15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/testguidelines.

16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

MÕISTE

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse/uuriti käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4

1. liide

C × t määramise eeskiri

1. Sissehingamisel avalduva mürgisuse hindamisel võib tavalise määramiseeskirja alternatiivina kaaluda astmelist C × t (kontsentratsioon × aeg) määramise eeskirja (12, 13, 14). Seda tuleks kasutada eelistatavalt juhul, kui konkreetne regulatiivne või teaduslik vajadus nõuab loomade katsetamist mitme ajavahemiku vältel, näiteks hädaolukorrale reageerimise või maakasutuse kavandamiseks. Sel juhul alustatakse tavaliselt piirkontsentratsioonil katsetamisest (I kokkupuude), mille puhul loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga viie ajavahemiku jooksul (näiteks 15, 30, 60, 120 ja 240 min), nii et ühe kokkupuute ajal püütakse saada andmed mitme ajavahemiku kohta (vt joonis 1). Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, on gaasi, auru ja aerosooli piirkontsentratsioon vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Neid tasemeid võib ületada ainult juhul, kui kõnealustel tasemetel katsetamiseks on regulatiivne või teaduslik vajadus (vt B.2 põhiteksti punkt 37).

2. Kui uuritava kemikaali mürgisuse kohta on vähe teavet või seda ei ole üldse, tuleks teha eeluuring, mille vältel loomarühmad, milles on kuni kolm looma kummastki soost, viiakse tavaliselt 240 minuti vältel kokkupuutesse uuringu juhi valitud sihtkontsentratsiooniga.

3. Kui I kokkupuute ajal katsetatakse piirkontsentratsiooni ja täheldatakse suremust alla 50 %, ei ole täiendav katsetamine vajalik. Kui on regulatiivne või teaduslik vajadus määrata kontsentratsiooni/aja/mõju vaheline seos piirkontsentratsioonist suuremal kontsentratsioonil, tuleks järgmine kokkupuude teha kõrgema tasemega, näiteks piirkontsentratsioonist kaks korda suurema kontsentratsiooniga (s.o 2L joonisel 1).

4. Kui piirkontsentratsiooni juures täheldatakse mürgisust, on vaja teha täiendav uuring (põhiuuring). Kõnealused täiendavad kokkupuuted tehakse kas väiksema kontsentratsiooniga (joonisel 1: II, III või IV' kokkupuude) või suurema kontsentratsiooniga, kasutades lühemaid ajavahemikke (joonisel 1: IV kokkupuude), mis on kohandatud ja mille vahed ei ole nii suured.

5. Katse (esialgne kontsentratsioon ja täiendavad kontsentratsioonid) tehakse, kasutades iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta kas ühte looma kummastki soost või kahte looma sellest soost, kumb on tundlikum. Mõnel juhul võib uuringu juht otsustada, et iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta kasutatakse kahte rotti kummastki soost (või nelja looma tundlikumast soost) (15). Kui kirjeldatud määramiseeskirja puhul kasutatakse iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta kahte looma kummastki soost, väheneb tavaliselt andmete kallutatus ja hinnangute muutlikkus, suureneb hinnangute täpsus ja paraneb hälvete kirjeldatavus usaldusvahemikuga. Täpsemad üksikasjad on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

6. Ideaaljuhul tehakse iga kokkupuude ühel päeval. See võimaldab viivitada järgmise kokkupuutega, kuni võib olla mõistlikult kindel, et loomad jäävad ellu, ja see võimaldab uuringu juhil kohandada järgmise kokkupuute jaoks sihtkontsentratsiooni ja ajavahemikku. Iga kokkupuudet soovitatakse alustada rühmaga, kelle kokkupuute kestus on kõige pikem, näiteks 240-minutilise kokkupuutega rühm, seejärel 120-minutilise kokkupuutega rühm jne. Kui näiteks loomad 240 minuti rühmas 90 minuti möödudes surevad või neil täheldatakse raske mürgistuse nähte (näiteks hingamisrütmi äärmuslikud muutused, nagu raske hingamine), ei ole mõistlik rühmale 120 minuti pikkust kokkupuudet korraldada, kuna suremus oleks tõenäoliselt 100 %. Seega peaks uuringu juht valima kõnealuse kontsentratsiooni jaoks lühemad kokkupuute ajavahemikud (näiteks 90, 65, 45, 33 ja 25 minutit).

▼M4

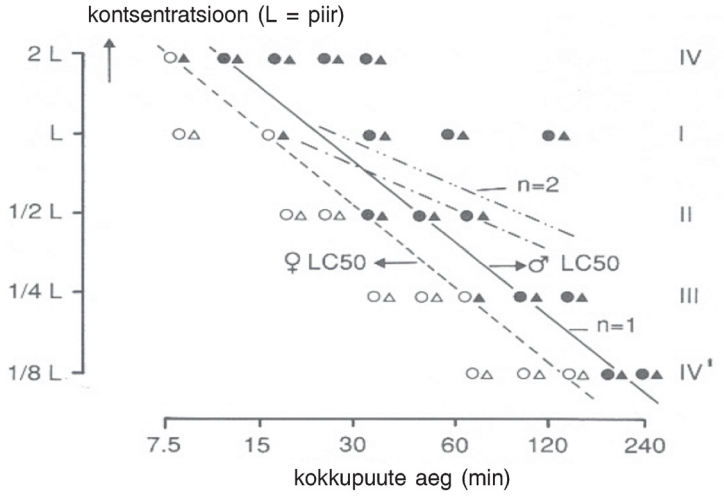
7. Kambrikontsentratsiooni tuleks mõõta sageli, et määrata kindlaks ajaga kaalutud keskmine kontsentratsioon kokkupuute iga ajavahemiku kohta. Alati kui on võimalik, tuleks statistilise analüüsi jaoks kasutada iga looma surmaaega (kokkupuute kestuse asemel).

8. Esimese nelja kokkupuute tulemusi tuleks uurida, et määrata kindlaks kontsentratsiooni ja aja kõvera andmelüngad (vt joonis 1). Kui kooskõla ei ole piisav, võib korraldada täiendava kokkupuute (5. kontsentratsioon). 5. kokkupuutekontsentratsioon ja ajavahemikud tuleks valida nii, et kõrvaldatakse kõnealune andmelünk.

9. Kõiki kokkupuuteid (sh esimest kokkupuudet) kasutatakse statistilise analüüsi alusel kontsentratsiooni, aja ja mõju vahelise seose arvutamiseks (16). Kui see on iga C × t intervalli puhul võimalik, siis tuleks kasutada ajaga kaalutud keskmist kontsentratsiooni ja kokkupuute kestust surmani (kui loom sureb kokkupuute ajal).

Joonis 1

Hüpoteetiline joonis kontsentratsiooni, aja ja suremuse vahelise seose kohta rottidel



Valged sümbolid = ellujäänud; mustad sümbolid = surnud loomad

Kolmnurgad = emased; ringid = isased

Katkematu joon = LC_{50} väärtused (vahemik 7,5–240 min) kõigi n = 1 isaste puhul

Katkendjoon = LC_{50} väärtused (vahemik 7,5–240 min) kõigi n = 1 emaste puhul

Punktiirjooned = hüpoteetilised LC_{50} väärtused isaste ja emaste puhul, kui n oleks olnud 2 (12).

Mõisted

kontsentratsioon

kokkupuute aeg

piir

▼M4

10. Allpool on esitatud astmelise toimimiskäigu näide.

I kokkupuude. Katse piirkontsentratsioonil (vt joonis 1)

— Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma ([a])

— Sihtkontsentratsioon ([b]) = piirkontsentratsioon.

— Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga kõnealusel sihtkontsentratsioonil vastavalt 15, 30, 60, 120 ja 240 minutiks.

↓

II kokkupuude ([c]). Põhiuuring

— Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.

— Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga väiksemal kontsentratsioonil ([d]) (1/2L) mõnevõrra pikemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on √2; vt joonis 1).

↓

III kokkupuude. Põhiuuring

— Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.

— Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga väiksemal kontsentratsioonil ([d]) (1/4L) mõnevõrra pikemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on √2; vt joonis 1).

↓

IV’ kokkupuude. Põhiuuring

— Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.

— Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga väiksemal kontsentratsioonil ([d]) (1/8L) mõnevõrra pikemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on √2; vt joonis 1).

↓ või

([a]) Kui soost sõltuva tundlikkuse andmeid ei ole, kasutatakse kummastki soost rotte, st üks loom kummastki soost iga kontsentratsiooni kohta. Olemasoleva teabe alusel või kui kõnealuse kokkupuute vältel selgub, et üks sugu on tundlikum, kasutatakse edasistes katsetes iga kontsentratsiooni kohta 10 tundlikumast soost looma (kaks looma iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta).

([b]) Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, siis on gaasi, auru ja aerosooli piirkontsentratsioon vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Kui eeldatakse mürgisust või kui mürgisus on tuvastatud eeluuringuga, tuleks valida väiksem lähtekontsentratsioon. Regulatiivse või teadusliku vajaduse korral võib kasutada suuremat kontsentratsiooni.

([c]) Ideaaljuhul tuleks loomade kokkupuude järgmisel kontsentratsioonil edasi lükata seni, kuni eelnevalt töödeldud loomade ellujäämises on mõistlikkuse piires veendutud. See võimaldab uuringu juhil kohandada järgmise kokkupuute sihtkontsentratsiooni ja ajavahemikke.

([d]) Minimaalne doos (kontsentratsioon × aeg), mis põhjustas esialgsel kontsentratsioonil katsetamise ajal surma (esimene kokkupuude), võetakse aluseks kontsentratsiooni ja kokkupuute ajavahemiku järgmise kombinatsiooni kindlaksmääramisel. Tavaliselt vähendatakse kontsentratsiooni kaks korda (1/2L) ja loomade kokkupuude kemikaalidega toimub uute väiksemate vahedega ajavahemike vältel. Kokkupuute ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on 1,4 (√2; vt viide 11) ja mille keskel on see aeg, kus esimese kokkupuute raames leiti minimaalne letaalne doos (aeg × kontsentratsioon). Kõnealusel joonisel (joonis 1) täheldati surma I kokkupuute vältel esmakordselt 15 minuti möödumisel; II kokkupuute ajavahemike keskel on seega 30 minutit ja ajavahemikud on 15, 21, 30, 42 ja 60 min. Pärast esimest kahte kokkupuudet on väga soovitatav koostada andmete alusel eespool näidatuga samalaadne joonis ning kontrollida, kas kontsentratsiooni ja aja sõltuvuse tõus on 45 kraadi (n = 1) või on kontsentratsiooni, aja ning mõju vaheline sõltuvus laugem (näiteks n = 2) või järsem (näiteks n = 0,8). Viimasel juhul on väga soovitatav edasiste kokkupuudete kontsentratsioone ja ajavahemikke selle alusel kohandada.

▼M4

IV kokkupuude. Põhiuuring

— Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.

— Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga suuremal kontsentratsioonil ([e]) (2L) mõnevõrra lühemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on √2; vt joonis 1).

C × t määramise eeskirja tulemuste matemaatiline tõlgendamine

11. Nelja või viie kokkupuutekontsentratsiooniga ja viie ajavahemikuga C × t määramise eeskiri annab tulemuseks vastavalt 20 või 25 andmepunkti. Kõnealuste andmepunktide põhjal on võimalik arvutada C × t seos statistilise analüüsi abil (16).

Võrrand 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

kus C = kontsentratsioon; t = kokkupuute kestus, või

võrrand 2:

$$toime = f(C^n t)$$

kus $n = b_1/b_2$.

Võrrandi 1 abil on võimalik arvutada LC_{50} väärtus konkreetse ajavahemiku jaoks (näiteks 4 tundi, 1 tund, 30 minutit või muu ajavahemik katsetatud ajavahemike piires), kasutades väärtust P = 5 (50 % vastus). Pange tähele, et Haberi seadus on kohaldatav ainult juhul, kui n = 1. LC_{01} saab arvutada P = 2,67 alusel.

([e]) Mõnikord võib olla vajalik suurendada kontsentratsiooni (2L) ja kasutada uusi veelgi väiksemate vahedega ajavahemikke; ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on 1,4 (√2) ja mille keskel on see aeg, kus esimese kokkupuute raames leiti minimaalne letaalne kontsentratsioon. Kokkupuute minimaalne kestus peaks eelistatavalt olema pikem kui 5 minutit; kokkupuute kestus ei tohiks ületada 8 tundi.

▼B

B.3. ÄGE MÜRGISUS (NAHAKAUDNE)

1. MEETOD

1.1. SISSEJUHATUS

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Testaine kantakse astmeliste annustena mitme rühma katseloomade nahale nii, et üks rühm saab ühesuguse annuse. Järgnevalt jälgitakse mõju ja surmajuhtumite esinemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

Tõsistele ja kestvatele kannatustele ja valule viitavate märkidega loomad võib vaja olla humaanselt surmata. Testaineid pole vaja annustada moel, mis teadaolevalt tekitab märgatavat söövitavatest või ärritavatest omadustest tingitud valu ja kannatusi.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Ettevalmistused**

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsepuurides katsele vastavatel pidamis- ja söötmistingimustel. Täiskasvanud noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse katserühmadesse. Ligikaudu 24 tundi enne katset eemaldatakse pügamise või raseerimise teel katseloomade keha seljaosalt karvkate. Karvkatte pügamisel või raseerimisel tuleb vältida naha marrastamist, kuna see võib mõjutada naha läbilaskvust. Testaine nahale kandmiseks tuleb vabastada vähemalt 10 % kehapinnast. Tahkete, vajaduse korral peenestatud ainete puhul tuleks testainet nahaga hea kokkupuute saavutamiseks niisutada piisava koguse vee või sobiva kandjaga. Kandja kasutamisel tuleb arvestada selle mõjuga testaine nahaläbimisvõimele. Vedelaid testaineid kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul.

1.6.2. **Katsetingimused**

1.6.2.1. *Katseloomad*

Kasutada võib täiskasvanud rotte või küülikuid. Kasutada võib ka muid liike, kuid seda tuleb põhjendada. Kasutada tuleks tavapäraseid laboritöös kasutatavaid liine. Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses kummagi soo puhul eraldi ei tohiks ületada ± 20 % vastavast keskmisest.

▼B

1.6.2.2. *Katseloomade arv ja sugu*

Iga annuse taseme kohta tuleb kasutada vähemalt viit katselooma. Nad peaksid olema samast soost. Emasloomade kasutamisel ei tohiks nad olla poeginud ega tiined. Kui on andmeid selle kohta, et ühe soo esindajad on märgatavalt tundlikumad, tuleks kasutada sellest soost loomi.

Märkus: ägeda mürgisuse katsetes närilistest kõrgemate loomadega tuleks kaaluda väiksema arvu loomade kasutamist. Annused tuleks valida hoolikalt ja vältida tuleks mõõdukalt mürgiste annuste ületamist. Testaine surmavate annuste manustamist tuleks sellistes katsetes vältida.

1.6.2.3. *Annused*

Erinevaid annusemäärasid peaks olema küllaldaselt, vähemalt kolm, ja nende vahed peaksid olema sellised, et saadakse erinevate mürgistusnähtude ja suremusega katserühmad. Annusemäärade valikul tuleks arvesse võtta mis tahes võimalikku ärritavat või söövitavat mõju. Andmeid peaks olema küllaldaselt annuse/reaktsioonikõvera koostamiseks ja võimalusel LD_{50} nõuetekohaseks määramiseks.

1.6.2.4. *Piirsisalduskatse*

Eespool kirjeldatud meetodi kohaselt võib teha piirsisalduskatse viiest isas- ja viiest emasloomast koosnevas rühmas annusega vähemalt 2 000 mg/kg kehakaalu kohta. Kui katses esineb ühendiga seotud suremust, võib kaaluda täiemahulise uuringu tegemist.

1.6.2.5. *Vaatlusperiood*

Vaatlusperioodi kestus peaks olema vähemalt 14 päeva. Vaatlemise kestust ei tohiks siiski jäigalt fikseerida. See peaks sõltuma mürgistusnähtudest, nende ilmnemise kiirusest ja paranemisperioodi pikkusest; seega võib seda vajadusel pikendada. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise aeg, nende kestus ja surma aeg on väga olulised, eriti kui surm saabub sageli hiljem.

1.6.3. **Katse käik**

Loomi tuleks puurides pidada ühekaupa. Testaine tuleks kanda ühtlaselt alale, mis moodustab ligikaudu 10 % kogu kehapinnast. Väga mürgiste ainete puhul võib katta väiksema osa kehapinnast, kuid võimalikult suur osa pinnast tuleks katta võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Testainet tuleks 24tunnise kokkupuuteperioodi jooksul poorse marlisideme ja mitteärritava kleeplindi abil naha vastas hoida. Manustamiskoht tuleks veel lisaks sobival moel kinni katta, et hoida marlisidet ja testainet paigal ja vältida testaine allaneelamist katselooma poolt. Et vältida testaine allaneelamist, võib kasutada looma liikuvust piiravaid vahendeid, kuid looma täielikku fikseerimist ei soovitata.

▼B

Kokkupuuteperioodi lõpus tuleks testaine jääk nahalt võimaluse korral veega või muu sobiva puhastusmeetodi abil eemaldada.

Vaatlustulemused tuleks vaatluse käigus süstemaatiliselt registreerida. Iga looma kohta tuleb pidada eraldi arvestust. Esimesel päeval tuleks loomi vaadelda tavapärasest sagedamini. Vähemalt kord tööpäevas tuleks läbi viia põhjalik kliiniline uuring; muid vaatlusi tuleks teha iga päev, rakendades sobivaid abinõusid loomade kao piiramiseks uuringus, nt surnuna leitud loomad lahata või külmutada ja nõrgad või surevad loomad eraldada või surmata.

Vaadelda tuleks muutusi nii karvkattes, testainega töödeldud nahas, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vereringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Erilist tähelepanu tuleks pöörata värinatele, krampidele, süljeeritusele, kõhulahtisusele, letargiale, unele ja koomale. Surmahetk tuleb registreerida võimalikult täpselt. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad. Registreerida tuleks kõik makropatoloogilised muutused. Vastaval näidustusel tuleks võtta koeproove histopatoloogilisteks uuringuteks.

Mürgisuse hindamine teisel sool

Uuringute lõpetamisel ühest soost katseloomadega annustatakse vähemalt viiest vastassoost loomast koosnevale rühmale, et kontrollida, ega selle soo esindajad testaine suhtes märgatavalt tundlikumad pole. Üksikjuhtudel võib olla õigustatud väiksema arvu loomade kasutamine. Kui on küllalt andmeid selle kohta, et uuritavast soost loomad on märgatavalt tundlikumad, võib katsetest vastassoost loomadega loobuda.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selle katse algul, iga looma surma aega, muude mürgistusnähtudega loomade arvu, mürgistusnähtude kirjeldust ja lahkamistulemusi. Kõik loomad kaalutakse ja mass registreeritakse vahetult enne testaine manustamist, seejärel igal nädalal ning surmahetkel; kui looma elumus katses ületab ühe päeva, tuleks arvutada ja registreerida tema massimuutused. Ühendiga seotud kannatuste ja valu tõttu humaanselt surmatud loomad registreeritakse ühendiga seotud suremusena. Tunnustatud meetodi kohaselt määratakse LD_{50}.

Andmetele hinnangu andmisel tuleks arvesse võtta kõigi kõrvalekallete, sealhulgas käitumuslike ja kliiniliste kõrvalekallete, makropatoloogiliste kahjustuste, kehamassi muutuste, suremuse ja mis tahes muude mürgistusnähtude mis tahes võimalikku sõltuvust kokkupuutest testainega ning nende esinemissagedust ja tõsidust.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

▼B

— liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne;

— katsetingimusi (sealhulgas naha puhastamise meetodit ja sideme tüüpi: oklusiivside või tavaline side);

— annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga ja kontsentratsioone);

— katseloomade sugu;

— tabelit reaktsiooni andmetega soo ja annuse määra järgi (st katse käigus surnud või surmatud loomade arvu, mürgistusnähtudega loomade arvu, kokkupuutes olnud loomade arvu);

— surma aega, arvestatuna annuse saamise ajast loomade humaanse surmamise põhjusi ja seejuures rakendatud kriteeriume;

— kõiki vaatlusandmeid;

— täiemahulises uuringus kasutatud soo 14 päeva kestel määratud LD_{50} väärtust (märkega määramismeetodi kohta);

— leitud LD_{50} väärtuse 95 % usaldusvahemikku (kui seda on võimalik esitada);

— annuse/suremuse kõverat ja selle tõusu (kui määramismeetod seda võimaldab);

— lahkamistulemusi;

— kõiki histopatoloogilisi leide;

— kõiki katsetulemusi teisest soost loomade puhul;

— tulemuste analüüsi (erilist tähelepanu tuleks pöörata katse ajal tehtud viidud humaanse surmamise võimalikule mõjule arvutatud LD_{50} väärtusele);

— tulemuste tõlgendust.

3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

4. **VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

▼**M8**

B.4. **ÄGE NAHAÄRRITUS/-SÖÖVITUS**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 404 (2015). Kemikaalidega katsete tegemist käsitlevaid OECD katsejuhendeid vaadatakse korrapäraselt läbi eesmärgiga tagada, et need kajastaksid parimaid olemasolevaid teadusandmeid. OECD katsejuhendi nr 404 läbivaatamisel on pööratud erilist tähelepanu võimalikele muudatustele seoses loomade heaolu parandamisega ja uuritavat kemikaali käsitleva kogu olemasoleva teabe hindamisele, et ära hoida tarbetute katsete tegemist laboriloomadega. OECD katsejuhendi nr 404 (algselt vastu võetud 1981. aastal ning muudetud aastatel 1992, 2002 ja 2015) ajakohastatud versioon sisaldab viidet juhenddokumendile nahaärrituse/-söövitusega seotud katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (1); nimetatud dokumendis pakutakse välja modulaarne lähenemisviis nahaärrituse ja nahasöövituse hindamiseks. Kõnealuse katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (1). Peale selle soovitatakse kõnealuses katsejuhendis kasutada algses *in vivo* katses katseloomal vajaduse korral kolme katselappi mitte üheaegselt, vaid üksteise järel.

2. Nahaärrituse ja nahasöövituse määratlus on esitatud käesoleva katsemeetodi liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

3. Nii usaldusväärsete teadustulemuste kui ka loomade heaolu huvides ei tohiks *in vivo* uuringuid ette võtta enne, kui kõiki kättesaadavaid andmeid uuritava kemikaali võimaliku nahka söövitava/ärritava toime kohta on hinnatud tõendite kaalukusel põhineva analüüsi teel, nagu on kirjeldatud juhenddokumendis nahaärrituse/-söövitusega seotud katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta, st selle juhenddokumendi kolme osa ja neile vastavate moodulite kohaselt (1). Lühidalt kirjeldatuna vaadeldakse olemasolevaid andmeid 1. osas seitsme mooduli alusel, mis hõlmavad andmeid inimese kohta, *in vivo* andmeid, *in vitro* andmeid, füüsikalis-keemilisi omadusi (nt pH, eelkõige tugev happelisus või aluselisus) ja katsetel mittepõhinevaid meetodeid. Teises osas viiakse läbi tõendite kaalukusel põhinev analüüs. Kui selle analüüsi tulemused on ebaselged, tuleks teha 3. osa kohased täiendavad katsed, alguses *in vitro* meetoditega ning viimase võimalusena *in vivo* katsed. Seega peaks kõnealune analüüs vähendama vajadust teha *in vivo* katseid selliste uuritavate kemikaalidega, mille puhul on muudest uuringutest saadud juba piisavalt tõendeid nende nahka söövitava/ärritava toime kohta.

IN VIVO KATSE PÕHIMÕTE

4. Uuritav kemikaal kantakse ühes annuses katselooma nahale; katselooma töötlemata nahapiirkondi kasutatakse negatiivse kontrollina. Ärrituse/söövituse ulatus registreeritakse ja seda hinnatakse kindlate ajavahemike järel ning mõju täielikuks hindamiseks lisatakse selle täiendav kirjeldus. Uuringu kestus peaks olema piisav, et hinnata täheldatud mõju pöörduvust või pöördumatust.

▼M8

5. Loomad, kellel täheldatakse mis tahes katseetapis pideva tugeva stressi ja/või valu tunnuseid, tuleks humaanselt surmata ning uuritava kemikaali hindamisel tuleks seda arvesse võtta. Otsustamiskriteeriumid surmaeelses seisundis või raskelt kannatavate loomade humaanseks surmamiseks on esitatud eraldi juhenddokumendis (2).

IN VIVO KATSE ETTEVALMISTAMINE

Loomaliigi valimine

6. Eelistatud laboriloom on albiinoküülik; kasutatakse noori terveid täiskasvanud küülikuid. Muude liikide kasutamisel tuleks esitada vastav põhjendus.

Loomade ettevalmistamine

7. Umbes 24 tundi enne katset tuleks loomade seljaosa karvad võimalikult lühikeseks lõigata. Tuleks vältida naha marrastamist ning kasutada tuleks üksnes terveid, terve nahaga loomi.

8. Mõnel küülikuliinil esineb tiheda karvastikuga laike, mis on teatavatel aastaaegadel silmatorkavamad. Selliseid tiheda karvastikuga piirkondi ei tohiks katses kasutada.

Pidamis- ja söötmistingimused

9. Loomi tuleks pidada ühekaupa. Katseloomade ruumi temperatuur peaks küülikute puhul olema 20 °C (± 3 °C). Ehkki suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, on sobivaim vahemik 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärast laborisööta ja piiramatus koguses joogivett.

KATSE KÄIK

Uuritava kemikaali kasutamine

10. Uuritav kemikaal tuleks kanda väikesele (umbes 6 cm^2 suurusele) nahapinnale ning katta see marlilapiga, mida hoiab paigal nahka mitteärritav teip. Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik otse nahale kanda (nt vedelikud ja mõned pastad), kantakse see esmalt marlilapile, mis seejärel asetatakse nahale. Lappi hoitakse kogu kokkupuuteperioodi vältel sobiva poolläbilaskva sideme abil õrnalt vastu nahka. Kui uuritav kemikaal kantakse lapile, tuleks lapp asetada nahale nii, et kemikaal puutuks nahaga korralikult kokku ja oleks nahal ühtlaselt jaotunud. Tuleks takistada looma ligipääsu lapile ning uuritava kemikaali allaneelamist ja sissehingamist.

11. Vedelaid uuritavaid kemikaale kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul. Kui katses kasutatakse tahket ainet (selle võib vajaduse korral pulbristada), tuleks uuritavat kemikaali niisutada võimalikult väikese koguse veega (või vajaduse korral muu sobiva kandeainega), et tagada hea kokkupuude nahaga. Kui kasutatakse muud kandeainet kui vett, peaks kandeaine võimalik mõju uuritava kemikaali põhjustatud nahaärritusele olema minimaalne või puuduma.

12. Kokkupuuteperioodi lõppedes ehk tavaliselt nelja tunni möödudes tuleks uuritava kemikaali jäägid võimaluse korral vee või sobiva lahusti abil eemaldada, muutmata seejuures marrasknaha terviklikkust ega selles tekkinud reaktsiooni.

▼M8

Annustamine

13. Katses kasutatavale pinnale kantakse 0,5 ml vedelikku või 0,5 g tahket ainet või pastat.

Algkatse (ühe loomaga *in vivo* katse nahaärrituse/-söövituse hindamiseks)

14. Kui tõendite kaalukusel põhinevast analüüsist või varasematest *in vitro* katsetest nähtub, et uuritav kemikaal on söövitav või ärritav või klassifitseerimata, ei ole täiendavate *in vivo* katsete tegemine tavaliselt vajalik. Kui aga lisaandmete kogumine osutub vajalikuks, viiakse *in vivo* katse esmalt läbi ühe loomaga ja seejuures kasutatakse järgmist lähenemisviisi. Loomale pannakse üksteise järel kuni kolm katselappi. Esimene lapp eemaldatakse kolme minuti pärast. Kui tõsist nahareaktsiooni ei täheldata, pannakse loomale teine lapp ja eemaldatakse see tunni aja pärast. Kui selles etapis tehtud vaatlustest ilmneb, et kokkupuudet võib humaanselt pikendada nelja tunnini, pannakse loomale kolmas lapp, eemaldatakse see nelja tunni pärast ja hinnatakse tekkinud reaktsiooni.

15. Kui kolmest kõnealusest järjestikusest kokkupuuteperioodist ükskõik millise järel täheldatakse söövitavat toimet, lõpetatakse katse kohe. Kui pärast viimase lapi eemaldamist ei täheldata söövitavat toimet, jälgitakse looma 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui söövitus ilmneb varem.

16. Kui uuritav kemikaal ei põhjusta eeldatavalt söövitust, kuid võib olla ärritav, tuleks ühele loomale panna üks lapp neljaks tunniks.

Kinnitav katse (täiendavate loomadega *in vivo* katse nahaärrituse hindamiseks)

17. Kui algkatses ei täheldata söövitavat toimet, tuleks ärritava toime olemasolu või puudumise kinnitamiseks kasutada veel kuni kahte looma ja iga looma puhul ühte lappi kokkupuuteperioodiga neli tundi. Kui algkatses täheldatakse ärritavat toimet, võib kinnitavas katses kasutada järjestikust hindamist või kanda kemikaali üheaegselt kahele lisaloomale. Kui erandjuhul ei ole algkatset tehtud, võib kahele või kolmele loomale asetada ühe lapi, mis eemaldatakse nelja tunni pärast. Kui kasutatakse kahte looma ja mõlemal täheldatakse sama reaktsiooni, ei ole vaja enam lisakatseid teha. Muul juhul tehakse katse ka kolmanda loomaga. Ebaselgete tulemuste hindamiseks võib olla vaja kasutada veel loomi.

Vaatlusperiood

18. Vaatlusperiood peaks olema piisavalt pikk, et võimaldada täielikult hinnata täheldatud toime pöörduvust. Siiski tuleks katse kohe lõpetada, kui loomal täheldatakse pideva tugeva valu või stressi tunnuseid. Toime pöörduvuse kindlakstegemiseks tuleks loomi jälgida kuni 14 päeva vältel pärast lapi eemaldamist. Kui pöörduvust täheldatakse enne 14 päeva möödumist, tuleks katse sel hetkel lõpetada.

Kliinilised vaatlused ja nahareaktsioonide hindamine

19. Kõikidel loomadel uuritakse nahapunetuse ja turse esinemist ning reaktsioone hinnatakse lapi eemaldamisest 60 minuti ning seejärel 24, 48 ja 72 tunni möödumisel. Ühe loomaga tehtavas algkatses vaadeldakse kokkupuutes olnud nahapinda ka vahetult pärast lapi eemaldamist. Nahareaktsioonide hindamiseks ja registreerimiseks kasutatakse allpool tabelis esitatud hindeid. Kui nahal esineb 72 tunni järel kahjustus, mis ei ole käsitatav ärrituse ega söövitusena, võib olla vaja teha vaatlusi kuni 14. päevani, et teha kindlaks toime pöörduvus. Peale ärrituse jälgimise tuleks täielikult kirjeldada kõiki

▼M8

paikseid mürgisuse ilminguid, näiteks naha rasvkoe kadumist, ja mis tahes süsteemseid kahjulikke toimeid (nt kliinilisi mürgisuse nähte ja mõju kehamassile) ning need registreerida. Ebaselgete tulemuste puhul tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

20. Nahareaktsioonide hindamine on paratamatult subjektiivne. Nahareaktsioonide hindamise ühtlustamiseks ning nii katseid läbi viivate laborite kui ka vaatlusi tegevate ja vaatlustulemusi tõlgendavate isikute abistamiseks on vaja vaatluste läbiviijad kasutatava hindamissüsteemiga (vt tabelit allpool) piisavalt kurssi viia. Seejuures võib olla abi illustreeritud juhendist nahaärrituse ja muude kahjustuste hindamiseks (3).

ANDMED JA ARUANDLUS

21. Uuringutulemused tuleks esitada lõplikus katseprotokollis tabeli kujul ja need peaksid hõlmama kõiki punktis 24 loetletud üksikasju.

Tulemuste hindamine

22. Nahaärrituse hindamisel tuleks ühtlasi arvesse võtta kahjustuse laadi ja raskusastet ning selle pöörduvust või pöördumatust. Üksikud hinded ei väljenda eraldivõetuna aine ärritava toime absoluuttaset, kuna samaaegselt hinnatakse ka uuritava aine muud toimet. Selle asemel tuleks üksikuid hindeid käsitada võrdlusväärtusena, mida tuleb hinnata koos kõikide muude uuringu käigus saadud vaatlustulemustega.

23. Ärritusreaktsioonide hindamisel tuleks arvesse võtta nahakahjustuste pöörduvust. Kui sellised reaktsioonid nagu alopeetsia (piiratud alal), hüperkeratoos, hüperplaasia ja kestendamine püsivad 14-päevase vaatlusperioodi lõpuni, tuleks uuritavat kemikaali käsitada ärritava kemikaalina.

Katseprotokoll

24. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

In vivo uuringu tegemise põhjendus:

— olemasolevatest katseandmetest, sealhulgas järjestikuse hindamise strateegia rakendamisel saadud tulemustest lähtuv tõendite kaalukusel põhinev analüüs;

— varasematest katsetest saadud asjakohaste andmete kirjeldus;

— igas katsestrateegia kohases etapis saadud andmed;

— tehtud *in vitro* katsete kirjeldus, sealhulgas katsete üksikasjalik käik ning uuritavate ja võrdlusainetega saadud tulemused;

— *in vivo* uuringu tegemist toetav tõendite kaalukusel põhinev analüüs.

Uuritav kemikaal:

— ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

▼**M8**

— mitmest koostisosast koosnev aine, segu või tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB): võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— allikas ja partii number, kui see on olemas;

— vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);

— uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;

— säilitustingimused.

Kandeaine:

— identimisandmed, kontsentratsioon (vajaduse korral), kasutatud kogus;

— kandeaine valimise põhjendus.

Katseloom(ad):

— kasutatud loomaliik/-liin, muu(de) looma(de) kui albiinoküüliku kasutamise korral sellekohane põhjendus;

— kummastki soost loomade arv;

— iga looma kaal katse alguses ja lõpus;

— vanus katse alguses;

— looma(de) päritolu, pidamistingimused, toitumisandmed jms.

Katsetingimused:

— lapi asetuskoha ettevalmistamise meetod;

— kasutatud lapimaterjalide ja lapi asetamise meetodi üksikasjad;

— uuritava kemikaali ettevalmistamise, pealekandmise ja eemaldamise üksikasjad.

Tulemused:

— ärritus-/söövitusnähtude hindamise tulemused iga looma kohta igal mõõtmiskorral tabeli kujul;

— kõikide täheldatud kahjustuste kirjeldus;

— täheldatud ärrituse või söövituse laadi ja astme jutustav kirjeldus ja võimalikud histopatoloogilised leiud;

— nahaärritusele ja -söövitusele lisanduvate muude kahjulike paiksete (nt naha rasvkoe kadumine) ja süsteemsete toimete kirjeldus.

▼**M8**

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances. Heaks kiidetud kemikaalikomitee ja kemikaalide töörühma 28. ühiskoosolekul novembris 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M8**

Tabel

Nahareaktsioonide Hindamine

Nahapunetuse ja raia tekkimine

Nahapunetust ei ..... esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (lihapunane) kuni punetuse hindamist takistava raia esinemine	4

Suurim võimalik punktide arv: 4

Turse tekkimine

Turset ei esine	0
Väga kerge (vaevumärgatav) turse	1
Kerge turse (ala servad on selgesti nähtavalt kõrgemal)	2
Mõõdukas turse (ala on ligikaudu 1 mm kõrgemal)	3
Tugev turse (ala on üle 1 mm kõrgemal ja levinud kokkupuutealast väljapoole)	4

Suurim võimalik punktide arv: 4

Ebaselgete tulemuste puhul võib teha histopatoloogilise analüüsi.

▼**M8**

Liide

MÕISTED

Kemikaal – aine või segu.

Nahasöövitus – pöördumatu nahakahjustuse, st marrasknahast pärisnahani ulatuva nähtava nekroosi tekkimine uuritava kemikaali kuni neljaks tunniks pealekandmise tagajärjel. Tüüpilised söövitusnähud on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

Nahaärritus – pöörduva nahakahjustuse tekkimine uuritava kemikaali kuni neljaks tunniks pealekandmise tagajärjel.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M7

B.5. SILMADE ÄGE ÄRRITUS/SÖÖVITUS

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 405 (2012). Kemikaalidega katsete tegemise OECD katsejuhendeid vaadatakse perioodiliselt läbi tagamaks, et need kajastaksid parimaid olemasolevaid teadusandmeid. Käesoleva meetodi eelnevates läbivaatamistes on pööratud erilist tähelepanu meetodi võimalikule täiustamisele kogu uuritavast kemikaalist olemasoleva teabe hindamise kaudu, et vältida tarbetuid loomkatseid, võttes seega arvesse loomade heaolu probleeme. Katsejuhendis nr 405 (vastu võetud 1981 ning ajakohastatud 1987, 2002 ja 2012) on soovitatud, et enne silmade ägeda ärrituse/söövituse jaoks kirjeldatud *in vivo* katse tegemist tuleb olemasolevate asjakohaste andmete alusel analüüsida tõendite kaalukust (1). Kui olemasolevad andmed on puudulikud, soovitatakse nende täiendamiseks kohaldada järjestikuste katsete tegemist (2, 3). See katsestrateegia hõlmab käesoleva katsemeetodi täiendmaterjalis esitatud valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* katsete tegemist. Määruse (EÜ) nr 1907/2006 (mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ([1])) kohaldamiseks lisatakse integreeritud katsestrateegia ka asjakohastesse Euroopa Kemikaaliameti (ECHA, edaspidi – „kemikaaliamet“) juhenditesse (21). Loomkatseid võib teha ainult juhul, kui pärast olemasolevate alternatiivsete meetodite kaalumist on kindlaks tehtud selliste katsete vajalikkus, ning teha võib ainult neid katseid, mille kohta on kindlaks tehtud, et need on asjakohased. Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi koostamise ajal on siiski veel olukordi, kui selle meetodi kasutamine on vajalik või nõutav teatavates õigusraamistikes.

Viimane ajakohastamine oli peamiselt keskendatud analgeetikumide ja anesteetikumide kasutamisele, ilma et see oleks mõjutanud katsejuhendi üldpõhimõtet ja ülesehitust. Alternatiivmeetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (ICCVAM) ([2]) ja rahvusvaheline sõltumatu teaduslik eksperthindamise komisjon vaatasid läbi pinnaanesteetikumide, süsteemsete valuvaigistite ja humaansete näitajate rutiinse kasutamise kasulikkuse ja piirangud silma ärrituse *in vivo* ohutuskatsetes (12). Läbivaatamise alusel järeldati, et pinnaanesteetikumide ja süsteemsete valuvaigistite kasutamisega välditaks suurt osa valust ja kannatusest või välditaks neid täielikult, ilma et see mõjutaks katse tulemust, ning soovitati, et neid aineid tuleks alati kasutada. Käesolevas katsemeetodis võetakse seda läbivaatamist arvesse. Silmade ägeda ärrituse ja söövituse *in vivo* katsete tegemisel tuleb tavapraktika korras kasutada pinnaanesteetikume, süsteemseid valuvaigisteid ja humaanseid näitajaid. Erandeid nende kasutamise suhtes tuleb põhjendada. Käesolevas meetodis kirjeldatud täiustamine vähendab oluliselt või aitab vältida loomade valu ja kannatusi enamikus katseolukordades, kui *in vivo* katsetamine on siiski vajalik, et teha kindlaks kemikaali ohutus silmadele.

Tasakaalustatud ennetav valuravi peab hõlmama: i) tavapärast premedikatsiooni pinnaanesteetikumiga (nt proparakaiin või tetrakaiin) ja süsteemse valuvaigistiga (nt buprenorfiin), ii) tavapärast käitlusjärgset süsteemse analgeesia skeemi (nt buprenorfiin ja meloksikaam), iii) loomade valu ja kannatuse kliiniliste sümptomite vaatluse, seire ja registreerimise ajakava ning iv) kõigi silmakahjustuste iseloomulike avalduste, raskusastme ja kulu vaatlust, seiret ja registreerimist.

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 18. detsembri 2006. aasta määrus (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ. ELT L 304, 22.11.2007, lk 1.

([2]) The US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

▼M7

Täiendavad üksikasjad on esitatud allpool kirjeldatud ajakohastatud katsejuhendites. Pärast uuritava kemikaali manustamist ei tohiks täiendavat pinnaanesteetikumi või valuvaigistit kasutada, et vältida uuringut segavat mõju. Põletikuvastase toimega valuvaigisteid (nt meloksikaam) ei tohi kasutada pindmiselt ning süsteemse toime annused ei tohi moonutada toimet silmadele.

Mõisted on esitatud käesoleva katsemeetodi liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

Nii teadusandmete õigsuse kui ka loomade heaolu huvides ei nähta *in vivo* katsete tegemist ette enne, kui tõendite kaalukuse analüüsi alusel on hinnatud kõiki olemasolevaid asjakohaseid andmeid uuritava kemikaali puhul silmi söövitava/ärritava toime võimalikkuse kohta. Sellised andmed hõlmavad tõendeid varem inimeste ja/või katseloomadega tehtud uuringutest, tõendeid ühe või mitme struktuuriliselt samalaadse aine või selliste ainete segude põhjustatud söövituse/ärrituse kohta, andmeid aine tugevast happelisusest või aluselisusest (4, 5) ning valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsete tulemusi silmade söövituse/ärrituse kohta (6, 13–17). Uuringud võivad olla tehtud enne tõendite kaalukuse analüüsi või selle tulemusena.

Teatavate kemikaalide puhul võib selline analüüs viidata vajadusele uurida kemikaali silmi söövitava/ärritava toime võimalikkust *in vivo*. Kõigil sellistel juhtudel tuleb enne *in vivo* silmakatsete tegemise kaalumist teha sellise kemikaali suhtes kõigepealt nahka söövitava toime *in vitro* ja/või *in vivo* uuring ning hinnata seda vastavalt katsemeetodi B.4 (7) järjestikuste katsete tegemise strateegiale või kemikaaliameti juhendis kirjeldatud integreeritud katsestrateegiale (21).

Järjestikuste katsete tegemise strateegia, mis hõlmab silmade söövituse/ärrituse valideeritud *in vitro* või *ex vivo* katsete tegemist, on esitatud käesoleva katsemeetodi täiendmaterjalis ning lisatud kemikaaliameti juhenditesse kemikaalide registreerimise, hindamise ja autoriseerimise (REACH) (21) eesmärgil. Seda katsestrateegiat soovitatakse järgida enne *in vivo* katsete tegemist. Uute kemikaalide puhul soovitatakse kemikaali söövitava/ärritava toime kohta teaduspõhiste andmete saamiseks etapiti katsetamist. Olemasolevate kemikaalide jaoks, mille puhul andmed nahka ja silmi söövitava/ärritava toime kohta ei ole piisavad, saab seda strateegiat kasutada puuduvate andmete hankimiseks. Muu katsestrateegia või -korra kasutamist või otsust loobuda etapiviisi katsetamisest tuleb põhjendada.

IN VIVO KATSE PÕHIMÕTE

Pärast premedikatsiooni süsteemse valuvaigistiga ja sobiva pinnaanesteesia esile kutsumist pannakse uuritav kemikaal ühekordse annusena katselooma ühte silma; kemikaaliga töötlemata silma kasutatakse kontrollina. Silma ärrituse/söövituse astet hinnatakse sidekesta, sarvkesta ja vikerkesta kahjustuste punktiskaala alusel teatud ajavahemike tagant. Kirjeldatakse ka muid toimeid silmale ning kahjulikke süsteemseid toimeid, et hinnata kogu toimet täielikult. Katse kestus peab olema piisav, et saaks hinnata vaadeldud toimete pöörduvust või pöördumatust.

Loomad, kellel mis tahes katseetapis avalduvad raske kannatuse ja/või valu sümptomid, mis vastavad selles katsemeetodis kirjeldatud humaansetele näitajatele (vt punkt 26), tuleb humaanselt hukata ning hinnata kemikaali sellele vastavalt. Otsustamiskriteeriumid surmaelses seisundis või raskelt kannatavate loomade humaanseks hukkamiseks on esitatud OECD juhendis (8).

▼M7

IN VIVO KATSE ETTEVALMISTAMINE

Loomaliigi valik

Eelistatud katseloom on albiinoküülik, kasutatakse terveid noori täiskasvanud loomi. Muu liigi või liini kasutamist tuleb põhjendada.

Loomade ettevalmistamine

Iga esialgu katseks valitud katselooma mõlemat silma tuleb uurida 24 tunni sees enne katse algust. Loomi, kellel esineb silmade ärritust, silmadefekte või juba olemasolevaid sarvkesta vigastusi, ei kasutata.

Pidamis- ja söötmistingimused

Loomi peetakse ühekaupa. Küülikute jaoks peab katseloomade ruumi temperatuur olema 20 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, on sobivaim vahemik 50–60 %. Kasutatakse tehisvalgustust, valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Liiga eredat valgust tuleb vältida. Söötmiseks võib kasutada labori tavapärast söödavalikut koos piiramatus koguses joogiveega.

KATSE KÄIK

Pinnaanesteetikumide ja süsteemsete valuvaigistite kasutamine

Silmadele ohutuse hindamisel soovitatakse katsete tegemisel kasutada valu ja kannatuste vältimiseks ja minimeerimiseks järgmisi meetodeid. Nende asemel võib kasutada ka muid meetodeid, mis tõendatult ning samaväärselt või paremini aitavad vältida või leevendada valu ja kannatusi.

— 60 minutit enne uuritava kemikaali silma panemist süstitakse subkutaanselt 0,01 mg/kg buprenorfiini, mis tagab süsteemse analgeesia piisava terapeutilise taseme. Buprenorfiinist ja teistest sarnastest süsteemselt manustatavatest opioidsetest valuvaigistitest ei ole ei teada ega põhjust eeldada, et need moonutaksid silma reaktsioone (12).

— Viis minutit enne uuritava kemikaali silma panemist tilgutatakse mõlemasse silma üks või kaks tilka silma pinnaanesteetikumi (nt 0,5 % proparakaiinhüdrokloriidi või 0,5 % tetrakaiinhüdrokloriidi). Soovitatakse kasutada säilitusainetevaba pinnaanesteetikumi, et vältida võimalikku uuringut segavat mõju. Iga looma puhul on kontrolliks see silm, kuhu ei ole pandud uuritavat kemikaali, vaid ainult pinnaanesteetikumi. Kui uuritav kemikaal põhjustab eeldatavasti olulist valu või kannatusi, ei tohiks seda üldjuhul *in vivo* katsetes kasutada. Juhul kui on kahtlusi või kui katse tegemine on siiski vajalik, tuleb enne uuritava kemikaali silma panemist ette näha täiendav pinnaanesteetikumi manustamine 5minutiliste intervallidega. Kasutajad peaksid arvestama, et mitu korda pinnaanesteetikumi manustamine võib põhjustada keemilise kahjustuse raskusastme vähest suurenemist ja/või selle paranemiseks kuluva aja pikenemist.

— Kaheksa tundi pärast uuritava kemikaali silma panemist süstitakse naha alla 0,01 mg/kg buprenorfiini ja 0,5 mg/kg meloksikaami, et tagada süsteemse analgeesia püsiv terapeutiline tase. Kuigi puuduvad andmed, mille alusel võiks eeldada, et meloksikaam avaldab kord päevas subkutaanselt manustatuna silmale põletikuvastast toimet, võib meloksikaami manustada mitte varem kui 8 tundi pärast uuritava kemikaali silma panemist, et vältida mis tahes võimalikku uuringut segavat mõju (12).

— Pärast 8 tunni möödumist uuritava kemikaali silma panemise järel tehtud esimesest süstimisest tuleb iga 12 tunni möödumisel süstida subkutaanselt buprenorfiini annuses 0,01 mg/kg ja lisaks iga 24 tunni järel 0,5 mg/kg

▼M7

meloksikaami kuni silmakahjustuste paranemiseni ning valu ja kannatustega seotud kliiniliste sümptomite kadumiseni. On olemas valuvaigisteid aeglaselt vabastavad ravimivormid, mille kasutamisega võiks arvestada, et vähendada valuvaigisti annustamise sagedust.

— Kui pärast uuritava kemikaali silma panemist selgub, et ennetav analgeesia ja pinnaanesteesia on ebapiisavad, tuleb kohe rakendada erakorralist analgeesiat. Kui loomal avalduvad uuringu käigus valu ja kannatusega seotud sümptomid, tuleb kohe subkutaanselt manustada buprenorfiini erakorralises annuses 0,03 mg/kg ning manustamist korratakse vajaduse korral sagedusega üks kord iga 8 tunni järel (selle asemel, et manustada ravimit subkutaanselt annuses 0,01 mg/kg kord iga 12 tunni järel). Meloksikaami manustatakse subkutaanselt annuses 0,5 mg/kg kord iga 24 tunni kohta koos buprenorfiini erakorralise annusega, kuid mitte varem kui 8 tundi pärast uuritava kemikaali silma panemist.

Uuritava kemikaali silma panemine

Uuritav kemikaal tuleb panna iga looma ühe silma sidekestakotti, milleks tuleb alumist laugu õrnalt silmamunast eemale tõmmata. Seejärel pigistatakse laud umbes üheks sekundiks õrnalt kinni, et vältida aine silmast väljavalgumist. Teine silm, kuhu uuritavat kemikaali ei kanta, toimib kontrollina.

Silmade loputus

Katseloomade silmi ei tohi loputada enne, kui on möödunud vähemalt 24 tundi uuritava kemikaali manustamisest, välja arvatud tahkiste kasutamise puhul (vt punkt 18) ning viivitamatult avaldunud söövitava või ärritava toime korral. 24 tunni pärast võib silmi loputada, kui see on vajalik.

Täiendava loomade rühma (nn satelliitrühma) kasutamine loputamise mõju uurimiseks ei ole soovitatav, välja arvatud juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud. Kui satelliitrühma on vaja, kasutatakse kahte küülikut. Loputustingimused tuleb üksikasjalikult dokumenteerida, nt selleks kulunud aeg; loputuslahuse koostis ja temperatuur; loputuse kestus, vedeliku kogus ja voolukiirus.

Annustamine

1) *Vedelike uurimine*

Vedelike uurimiseks kasutatakse annust 0,1 ml. Pumppihustit ei tohi kemikaali otse silmale kandmiseks kasutada. 0,1 ml silma tilgutamiseks tuleb pihustatav vedelik enne väljutada ja koguda proovinõusse.

2) *Tahkiste uurimine*

Tahkiste, pastade ja peenosakestest koosnevate kemikaalide uurimisel kasutatav kogus on ruumalaga 0,1 ml või massiga kuni 100 mg. Uuritav kemikaal peab olema jahvatatud peentolmuks. Tahke materjali kogust tuleb mõõta pärast selle ettevaatlikku tihendamist, nt mõõteanuma raputamisega. Kui esimese vaatluse ajal (üks tund pärast kemikaali silma panemist) ei ole tahke kemikaal katselooma silmast füsioloogiliste mehhanismide abil eemaldatud, võib silma loputada füsioloogilise lahuse või destilleeritud veega.

3) *Aerosoolide uurimine*

Iga pumppihustis olev kemikaal (pihus või aerosool) on soovitatav silma tilgutamiseks eelnevalt koguda. Üks erand on aerosoolmahutites rõhu all olevad kemikaalid, mida ei saa koguda aurustumise tõttu. Sellisel juhul tuleks hoida looma silm lahti ja pihustada uuritav kemikaal otse sellesse 10 cm kauguselt silma eest ligikaudu üks sekund kestva purskega. Kaugus silmast võib varieeruda sõltuvalt kemikaalist pihustis ja selle rõhust. Tuleb olla ettevaatlik, et pihusejoa rõhk ei kahjustaks silma. Vajaduse korral tuleb hinnata võimalust, kas pihustatava kemikaali avaldatav rõhk ei tekita mehaanilist silmakahjustust.

▼M7

Aerosooli annust võib hinnata järgmise mudelkatsega. Kemikaali pihustatakse kaalupaberile läbi otse selle ees oleva avause, mis on küüliku silma suurune. Paberi kaalu suurenemise järgi hinnatakse ligikaudne silma pihustatav kogus. Lenduvate kemikaalide puhul võib annust hinnata, kui kaaluda kogumisnõu enne ja pärast uuritava kemikaali eemaldamist.

Eelkatse (silma ärrituse/söövituse *in vivo* katse ühe loomaga)

In vivo eelkatses on väga soovitatav kasutada vaid üht looma (vt käesoleva katsemeetodi täiendmaterjali: „Järjestikuste katsete tegemise strateegia silmade ärrituse ja söövituse uurimiseks“). Vaatlused peavad võimaldama määrata silmakahjustuse raskusastet ja pöörduvust enne kinnitava katse tegemist teisel katseloomal.

Kui selle katse tulemustest nähtub, et kemikaal on kirjeldatud meetodi järgi tehtud katse põhjal silma söövitav või tugevalt ärritav, ei ole vaja täiendavaid silma ärrituse katseid teha.

Kinnitav katse (silma ärrituse *in vivo* katse täiendavate katseloomadega)

Kui söövitavat või tugevalt ärritavat toimet ei ole eelkatses täheldatud, tuleb ärritava või negatiivse reaktsiooni kinnitamiseks teha lisakatse veel kahe katseloomaga. Kui ärritav toime sedastatakse eelkatses, siis on soovitatav, et kinnitav katse tehtaks katsete järjestikuse tegemise põhimõtte kohaselt, s.o kasutada katse kohta korraga pigem üht looma kui teha katse samaaegselt mõlema lisaloomaga. Kui teisel loomal avaldub söövitavaid või tugevalt ärritavaid toimeid, siis katset enam ei jätkata. Kui teise loomaga tehtud katse tulemused on piisavad ohuklassifikatsiooni määramiseks, siis täiendavaid katseid ei tehta.

Vaatlusperiood

Vaatlusperioodi kestus peab olema piisav, et hinnata täielikult vaadeldava toime ulatust ja pöörduvust. Katse tuleb siiski lõpetada kohe, kui loomal avalduvad tugeva valu või kannatuse sümptomid (8). Toime pöörduvuse üle otsustamiseks tuleb loomi üldjuhul pärast uuritava kemikaali manustamist jälgida 21 päeva jooksul. Kui toime pöörduvus ilmneb enne 21 päeva möödumist, tuleb katse lõpetada sel ajal.

Kliiniline vaatlus ja silma reaktsioonide raskusastme hindamine

Silmi tuleb silmakahjustuse esinemise või puudumise suhtes üks tund pärast uuritava kemikaali silma panemist põhjalikult hinnata, pärast seda tuleb nende seisundit hinnata vähemalt kord päevas. Loomade seisundit tuleb esimese kolme päeva jooksul hinnata mitu korda päevas, et õigeaegselt otsustada katse lõpetamise üle. Katseloomi tuleb tavapraktika korras hinnata kogu uuringu jooksul vähemalt kaks korda päevas valu ja/või kannatuse kliiniliste sümptomite esinemise suhtes (nt silma korduv kraapimine või hõõrumine, liigne pilgutamine, liigne pisaravool) (9–11), vaatlustevaheline ajavahemik on vähemalt 6 tundi (vajaduse korral hinnatakse sagedamini). See on vajalik, et i) hinnata katseloomadel valu ja kannatuse avaldumise tõendeid piisavalt, otsustamaks tõenduspõhiselt valuvaigistite annuse suurendamise vajaduse üle, ja ii) hinnata katseloomi kindlaksmääratud humaansete näitajate alusel, et otsustada tõenduspõhiselt, kas loomade humaanne eutanaasia on asjakohane, ning et tagada selliste otsuste õigeaegsus. Selleks et hinnata ja mõõta silmakahjustust ning otsustada kehtestatud humaansete näitajate alusel humaanse eutanaasia vajaduse üle, kasutatakse

▼M7

rutiinse abivahendina fluorestseiiniga värvimist ja vajaduse korral biomikroskoopi (nt sarvkesta haavandumise korral kahjustuse sügavuse hindamiseks). Sedastatud silmakahjustuste digifotod võib koguda tõendusmaterjaliks ja silmakahjustuse ulatuse dünaamika pidevaks dokumenteerimiseks. Loomi tohib pidada katses vaid nii kaua, kuni lõplikud andmed on saadud. Loomad, kel avalduvad tugeva valu või kannatuse nähud, tuleb viivitamata humaanselt hukata, ning kemikaali tuleb hinnata vastavalt sellele.

Loomad, kel on pärast kemikaali silma tilgutamist tekkinud järgmised silmakahjustused, tuleb humaanselt hukata (kahjustuste raskusastme kirjeldus on esitatud tabelis 1): sarvkesta perforatsioon või sarvkesta oluline haavand, sealhulgas stafüloom; veri silma eeskambris; sarvkesta 4. astme hägustumine; valgusrefleksi puudumine (2. astme pupillireaktsioon), mis püsib 72 tunni jooksul; sidekesta haavandumine; sidekesta või pilkkile nekroos; või niiske kärbus. Seda seetõttu, et sellised kahjustused üldiselt on pöördumatud. Peale selle soovitatakse selleks, et lõpetada katse enne 21päevase vaatlusperioodi lõppu, kasutada humaansete näitajatena järgmisi silmakahjustusi. Neid kahjustusi peetakse prognostilisteks silma tugeva ärrituse või selliste söövitusvigastuste puhul, mis on 21päevase vaatlusperioodi jooksul pöördumatud: väga sügav vigastus (nt sarvkesta haavand, mis ulatub pealmistest strooma kihtidest sügavamale), limbuse lagunemine > 50 % (mida tõendab sidekesta koe kahvatuks ja värvusetuks muutumine) ning raske silmainfektsioon (mädane eritis). Koos esinevaid sarvkesta pinna vaskularisatsiooni (st pannus), fluorestseiiniga värvunud pindala suuruse muutumatust (st igapäevase hindamise alusel see ei vähene) ja/või viie päeva möödumisel pärast kemikaali silma panekut reepiteliseerumise puudumist võib samuti pidada võimalikeks kasulikeks kriteeriumideks, mis võivad mõjutada kliinilist otsust uuringu varasema lõpetamise suhtes. Eraldi esinevatena ei ole need leiud siiski piisavad, et põhjendada uuringu varasemat lõpetamist. Kui on tuvastatud raske toime silmale, tuleb kliinilise läbivaatuse jaoks konsulteerida raviva veterinaararsti või katseloomadele spetsialiseerunud veterinaararstiga või kliiniliste kahjustuste diagnostika valdkonnas koolitatud töötajaga, et otsustada, kas nende nähtude koosesinemine on aluseks uuringu varasemale lõpetamisele. Silma (side-, sarv- ja vikerkesta) reaktsiooni astet tuleb hinnata ja dokumenteerida 1, 24, 48 ja 72 tunni möödumisel uuritava kemikaali silma panekust. Loomad, kellel ei teki silmakahjustusi, võib hukata mitte varem kui kolm päeva pärast kemikaali silma tilgutamist. Loomi, kelle silmakahjustused ei ole rasked, tuleb jälgida seni, kuni kahjustused paranevad või 21 päeva, misjärel katse lõpetatakse. Selleks et määrata kahjustuste seisund ja otsustada nende pöörduvuse või pöördumatuse üle tuleb vaatlusi teha ja nähtu dokumenteerida vähemalt 1 tunni, 24 tunni, 48 tunni, 72 tunni, 7 päeva, 14 päeva ja 21 päeva järel. Vaatluste sagedust tuleb vajaduse korral suurendada, et otsustada, kas katseloom tuleb humaansetest kaalutlustest lähtudes hukata või eemaldada uuringust negatiivsete tulemuste tõttu.

Silmakahjustuste astmed (tabel 1) tuleb registreerida iga läbivaatuse ajal. Kõigist muudest silmakahjustustest (nt pannus, värvumine, eeskambri muutused) või kahjulikust süsteemsest toimest tuleb samuti teatada.

Reaktsioonide uurimist lihtsustab binokulaarluubi, käsi-pilulambi, biomikroskoobi või muu sobiva seadme kasutamine. Pärast 24 tunni vaatluste registreerimist võib silmi edasi uurida fluorestseiini abil.

Silma reaktsioonide hindamine on vältimatult subjektiivne. Silma reaktsiooni hindamise ühtlustamiseks ning selleks, et aidata katselaboreid ja neid, kes vaatlusi läbi viivad või tõlgendavad, tuleb personali, kes vaatlusi teeb ja tõlgendab, kasutatava hindamissüsteemi mõistmiseks piisavalt koolitada.

▼M7

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste hindamine

Silma ärrituse punktisummasid tuleks hinnata vastavalt kahjustuste iseloomulikele omadustele ja raskusastmele ning nende pöörduvusele või pöördumatusele. Üksikud punktisummad ei ole kemikaali hindamisel silmi ärritavate omaduste absoluutne standard, sest hinnatakse ka uuritava kemikaali muid toimeid. Selle asemel tuleks üksikuid punktisummasid käsitada võrdlusväärtustena ja need on tähenduslikud üksnes siis, kui neid täiendavad kõigi vaatlusandmete täielik kirjeldamine ja hindamine.

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

In vivo katse tegemise põhjendus – tõendite kaalukuse analüüs varasemate katseandmete, sealhulgas järjestikuste katsete tegemise strateegiaga saadud tulemuste põhjal:

— varasematest katsetest saadud asjakohaste andmete kirjeldus;

— katsestrateegia igal etapil saadud andmed;

— tehtud *in vitro* katsete kirjeldus, sealhulgas katse korralduse üksikasjad, uuritavate kemikaalide / võrdluskemikaalidega saadud tulemused;

— tehtud nahaärrituse/-söövituse *in vivo* uuringu kirjeldus, sealhulgas saadud tulemuste kirjeldus;

— tõendite kaalukuse analüüs *in vivo* uuringu tegemiseks.

Uuritav kemikaal:

— identifitseerimisandmed (nt kemikaali nimetus ja võimaluse korral CASi number, puhtus, teadaolevad lisandid, allikas, partiinumber);

— iseloomulikud füüsikalised ja füüsikalis-keemilised omadused (nt pH, lenduvus, lahustuvus, stabiilsus, reageerimine veega);

— segu korral tuleb nimetada koostisosad, sealhulgas koostisainete identifitseerimisandmed (nt keemilised nimetused ja võimaluse korral CASi numbrid) ning kontsentratsioonid;

— kasutatud annus.

Vehiikul:

— nimetus, kontsentratsioon (vajaduse korral), kasutatud kogus;

— vehiikuli valiku põhjendus.

Katseloomad:

— kasutatud loomaliik/-liin, põhjendus muu loomaliigi kui albiinoküüliku kasutamiseks;

— iga looma vanus uuringu alguses;

— eri soost loomade arv katse- ja kontrollrühmas (kui vajalik);

— iga looma mass katse alguses ja lõpus;

— päritolu, pidamistingimused, söötmine jne.

▼M7

Anesteetikumid ja valuvaigistid:

— manustatud pinnaanesteetikumide ja süsteemsete valuvaigistite annused ja manustamiskorrad;

— kui kasutatakse lokaalanesteetikumi, selle identifitseerimisandmed, puhtus, liik, annus ja võimalik interaktsioon uuritava kemikaaliga.

Tulemused:

— iga vaatluse ajal punktiskaala alusel ärrituse hindamiseks kasutatud meetodi kirjeldus (nt käsi-pilulamp, biomikroskoop, fluorestseiin);

— kuni katseloomade kõrvaldamiseni katsest iga vaatluse ajal igal loomal avaldunud ärritus-/söövitusreaktsioonide andmed tabelina;

— täheldatud ärrituse või söövituse raskusastme ja iseloomulike omaduste kirjeldus;

— muude täheldatud silmakahjustuste kirjeldus (nt vaskularisatsioon, pannuse teke, liited, värvumine);

— silmaväliste lokaalsete ja süsteemsete kahjulike toimete kirjeldus, valu ja kannatusega seotud kliiniliste sümptomite kirjeldus, digifotod ja histopatoloogilised leiud nende olemasolu korral.

Tulemuste arutelu

Tulemuste tõlgendamine

Silma ärrituse uuringute loomkatsetest saadud tulemuste ekstrapolatsioon inimesele kehtib üksnes piiratud ulatuses. Paljudel juhtudel on albiinoküülikud silma ärritavate või söövitavate ainete suhtes tundlikumad kui inimesed.

Andmete tõlgendamisel tuleb olla hoolikas, et välistada sekundaarsest infektsioonist tingitud ärritus.

KIRJANDUS

(1) Barratt, M.D.*et al.* (1995), „The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8“, *ATLA* 23, 410–429.

(2) de Silva, O. *et al.* (1997), „Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies“, *Food Chem. Toxicol* 35, 159–164.

(3) Worth A. P. and Fentem J. H. (1999), „A general approach for evaluating stepwise testing strategies“, *ATLA* 27, 161–177.

(4) Young, J.R. *et al.* (1988), „Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals“, *Toxicol. In Vitro*, 2, 19–26.

(5) Neun, D.J. (1993), „Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH“, *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227–231.

(6) Fentem, J.H. *et al.* (1998), „The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team“, *Toxicology in vitro* 12, pp. 483–524.

(7) Käesoleva lisa peatükk B.4, *„Äge nahaärritus/-söövitus“*.

▼**M7**

(8) OECD (2000). „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, *OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 19*, (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), „Animal pain: evaluation and control“, *Lab Animal*, May/June, 20–36.

(10) National Research Council (NRC) (2008), *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*, Washington, DC: The National Academies Press.

(11) National Research Council (NRC) (2009), *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*, Washington, DC: The National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), „ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or

Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing“, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Käesoleva lisa peatükk B.40, *„Nahasöövituskatse in vitro: transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmine“*.

(14) Käesoleva lisa peatükk B.40bis, *„Nahasöövituskatse in vitro: katse inimnaha mudeliga“*.

(15) OECD (2006), „*Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*“, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*, OECD, Paris.

(16) Käesoleva lisa peatükk B.47, „Veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega“.

(17) Käesoleva lisa peatükk B.48, „Isoleeritud kanasilma katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega“.

(18) U.S. EPA (2003), „*Label Review Manual: 3rd Edition*“, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

(19) UN (2011), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, 4. läbivaadatud väljaanne, New York & Geneva: United Nations Publications.

(20) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

(21) „ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance“,

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

Tabel 1

Silmakahjustuste hindamise skaala

Sarvkest	Aste
Hägusus: tihedusaste (mõõta tuleb kõige läbipaistmatumast kohast) (*)	
Haavandumist või hägusust ei esine.	0
Üksikud hajutatud või difuussed hägususalad (v.a tavapärase läike kerge tuhmumine); vikerkesta ehituse üksikasjad on selgelt näha	1
Selgelt eristuv läbikumav ala; vikerkesta detailid on veidi ebaselged	2
Pärlmutrine ala; vikerkesta detailid ei eristu, pupilli suurus on vaevu eristatav	3
Läbipaistmatu sarvkest; vikerkest ei eristu hägususe tõttu	4
Suurim võimalik punktide arv: 4	
Vikerkest	
Normaalne	0
Selgesti süvenenud kurrud, kongestsioon, turse, sarvkesta ümber mõõdukas hüpereemia; või injektsioon; vikerkest reageerib valgusele (reaktsiooni hilinemist käsitatakse toimena)	1
Verejooks, ulatuslik vikerkesta hävimine või puudub reaktsioon valgusele	2
Suurim võimalik punktide arv: 2	
Sidekest	
Punetav (laugude ja silmamuna sidekest; välja arvatud sarv- ja vikerkest)	
Normaalne	0
Mõned hüpereemilised veresooned (injektsioon)	1
Difuusne sügavpunane värvus; üksikud veresooned ei eristu selgesti	2
Difuusne tumepunane	3
Suurim võimalik punktide arv: 3	
Kemoos	
Turse (laugude ja/või pilkkile turse)	
Normaalne	0
Normist suurem turse	1
Väljendunud turse, lau osaline väljapöördumine	2
Turse, laud poolsuletud	3
Turse, laud rohkem kui poolsuletud	4
Suurim võimalik punktide arv: 4	

(*) Sarvkesta hägususala tuleb registreerida.

▼M7

Liide

MÕISTED

Astmeline lähenemisviis – etapiviisi katsete tegemise strateegia, milles enne järgmise etapiga alustamist vaadatakse uuritava kemikaali kohta kindlaksmääratud korras läbi kogu olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse menetlust, et otsustada, kas teave on piisav ohuklassi määramiseks. Kui olemasoleva teabe põhjal saab otsustada uuritava kemikaali ärritavate omaduste üle, ei ole täiendavaid katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa otsustada uuritava kemikaali ärritava toime võimalikkuse üle, jätkatakse järjestikuste loomkatsete etapiti tegemist, kuni kemikaali saab üheselt klassifitseerida.

Kemikaal – aine või segu.

Mitteärritava toimega kemikaal – aine, mida ei klassifitseerita silma ärritavana EPA I, II või III kategooriasse; või silmi ärritavana GHSi kategooriasse 1, 2, 2A või 2B; või ELi 1. või 2. kategooriasse (17–19).

Puhvermahtuvus – happeliste valmististe puhul on see naatriumhüdroksiidi kogus 100 g valmistise kohta (g), mida on vaja konkreetse pH saavutamiseks; aluseliste valmististe puhul on see naatriumhüdroksiidi kogus 100 g valmistise kohta (g), mis on ekvivalentne väävelhappe kogusega 100 g valmistise kohta (g), mida on vaja konkreetse pH saavutamiseks (Young jt, 1988).

Silma söövitava toimega kemikaal – a) kemikaal, mis põhjustab silma pöördumatut koekahjustust; b) kemikaal, mis klassifitseeritakse silma ärritavana GHSi 1. kategooriasse või EPA I kategooriasse või ELi 1. kategooriasse (17–19).

Silma tugevalt ärritava toimega kemikaal – a) kemikaal, mis põhjustab silma koekahjustuse, mis ei parane 21 päeva jooksul pärast kemikaali silma panekut, või põhjustab tugeva füüsilise nägemislanguse; b) kemikaal, mis klassifitseeritakse silma ärritavana GHSi 1. kategooriasse või EPA I kategooriasse või ELi 1. kategooriasse (17–19).

Silma ärritava toimega kemikaal – a) kemikaal, mis põhjustab silma pöörduvat koekahjustust; b) kemikaal, mis klassifitseeritakse silma ärritavana EPA II või III kategooriasse; või GHSi kategooriasse 2, 2A või 2B; või ELi 2. kategooriasse (17–19).

Tõendite kaalukus (protsess) – kogu teabe kogumise tugevate ja nõrkade külgede analüüsi kasutatakse selleks, et teha selle alusel järeldus, mida ei ole võimalik üksikandmete põhjal tõenduspõhiselt teha.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M7

KATSEMEETODI B.5 TÄIENDMATERJAL ([1])

JÄRJESTIKUSTE KATSETE TEGEMISE STRATEEGIA SILMA ÄRRITUSE JA SÖÖVITUSE UURIMISEKS

Üldkaalutlused

Teadusandmete õigsuse ja loomade heaolu huvides on oluline vältida loomade tarbetut kasutamist ja minimeerida selliste katsete tegemist, mis tõenäoliselt tekitavad loomadel raskeid reaktsioone. Kogu teavet kemikaali võimaliku silmi ärritava/söövitava toime kohta tuleb hinnata enne *in vivo* katsete tegemise kaalumist. Piisav tõendusmaterjal uuritava kemikaali klassifitseerimiseks selle võimaliku silmi ärritava või söövitava toime suhtes võib juba olemas olla, ilma et oleks vaja teha loomkatseid. Seega minimeerivad tõendite kaalukuse analüüs ja järjestikuste katsete tegemise strateegia *in vivo* katsetamise vajadust, eriti juhul, kui kemikaal põhjustab tõenäoliselt raskeid reaktsioone.

Tõendite kaalukuse analüüsi on soovitatav kasutada kemikaali silmi ärritava ja söövitava toime kohta olemas oleva teabe hindamiseks, et otsustada, kas selle toime iseloomustamiseks saaks täiendavalt teha muid kui *in vivo* silmauuringuid. Kui on vaja teha täiendavaid uuringuid, on soovitatav asjakohaste katseandmete saamiseks kasutada järjestikuste katsete tegemise strateegiat. Kui aine kohta ei ole katseandmeid, tuleb kasutada järjestikuste katsete strateegiat, et saada andmeid, mida on vaja silmi ärritava/söövitava toime hindamiseks. Käesolevas täiendmaterjalis kirjeldatud eelkatsete tegemise strateegia on välja töötatud OECD töörühma poolt (1). Strateegia kinnitati ja seda laiendati hiljem keemiliste ainete mõju inimeste tervisele ja keskkonnale käsitleva ohtude integreeritud ja harmoneeritud klassifitseerimise süsteemis, mis kiideti heaks kemikaalikomitee ja kemikaalitöörühma 28. ühisistungil 1998. aasta novembris (2) ja ajakohastati OECD eksperdirühma poolt 2011. aastal.

Kuigi see strateegia ei ole B.5 katsemeetodi lahutamatu osa, väljendab see soovitatavat lähenemisviisi silmi ärritavate/söövitavate omaduste kindlaks tegemiseks. See lähenemisviis esindab nii hea tava kui ka eetikapõhist võrdlusalust silmi ärritava/söövitava toime *in vivo* katsete tegemisel. Selles katsemeetodis on esitatud *in vivo* katse tegemise juhised ning kokkuvõte teguritest, mida tuleb käsitleda enne sellise katse kaalumist. Järjestikuste katsete tegemise strateegiaga nähakse ette tõendite kaalukusel põhinev lähenemisviis uuritava kemikaali silmi ärritavate/söövitavate omaduste hindamiseks ja astmelisel katsete tegemise strateegial põhinev lähenemisviis asjakohaste andmete saamiseks kemikaali kohta, mille suhtes on vaja teha täiendavaid uuringuid või millega ei ole veel katseid tehtud. Strateegia hõlmab kõigepealt valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsete tegemist ning seejärel erandlikel asjaoludel katsemeetodi B.4 uuringute tegemist (3, 4).

Etapiviisi katsetamise strateegia kirjeldus

Enne katsete tegemist tuleb järjestikuste katsete tegemise strateegia (joonis) osana hinnata kogu olemasolevat teavet *in vivo* silmakatsete vajaduse määramiseks. Kuigi üksikute parameetrite hindamisel võib saada olulist teavet (nt äärmuslik pH-väärtus), tuleb olemasolevat teavet hinnata terviklikult. Tõendite kaalukuse alusel otsustamiseks tuleb hinnata kõiki asjakohaseid andmeid uuritava kemikaali ja selle struktuurianaloogide toime kohta ja tehtud otsuse kohta tuleb esitada

([1]) REACH-määruse alusel integreeritud katsestrateegia kasutamiseks silma ärrituse puhul vt ka kemikaaliameti juhendit „Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a Endpoint specific guidance“ (Teabele esitatavate nõuete ja kemikaaliohutuse hindamine, peatükk R.7a: näitajate põhine juhend) http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

põhjendus. Peamine rõhuasetus tuleks teha inimeste või loomade kohta seoses kemikaaliga juba olemas olevatele andmetele ning seejärel kemikaali *in vitro* või *ex vivo* uurimise tulemustele. Kui vähegi võimalik, tuleb söövitavate kemikaalide puhul *in vivo* uuringuid vältida. Katsete tegemise strateegias võetakse arvesse järgmisi tegureid.

Olemasolevate inim- ja/või loomuuringutest saadud andmete ja/või valideeritud ja rahvusvaheliselt tunnustatud meetoditega tehtud *in vitro* katsetest saadud andmete hindamine (1. etapp).

Kõigepealt tuleb arvesse võtta olemasolevaid andmeid inimese kohta, nt kliinilisi ja töötervishoiu uuringuid või ravijuhtusid, ja/või silmauuringute loomkatsete andmeid ja/või valideeritud ja rahvusvaheliselt tunnustatud meetoditega tehtud *in vitro* silma ärrituse/söövituse katsete andmeid, sest nendest saab teavet, mis on otseselt seotud kemikaali toimega silmadele. Seejärel tuleb hinnata andmeid, mis on saadud nahaärrituse/-söövituse inim- ja/või loomuuringutest ja/või valideeritud ja rahvusvaheliselt tunnustatud meetoditega tehtud nahasöövituse *in vitro* uuringutest. Teadaolevalt silmi ärritava või söövitava toimega kemikaale ning kemikaale, millel on nahka söövitav või tugevasti ärritav toime, ei tohi loomadele silma tilgutada; sellised kemikaalid tuleb lugeda ka silmi söövitavateks ja/või ärritavateks. Samuti ei tohi *in vivo* silmauuringuid teha kemikaalidega, mille kohta on varasematest silmauuringutest saadud piisavad tõendid, et need ei ole söövitavad ega ärritavad.

Struktuuri-aktiivsuse seose (structure activity relationship, SAR) analüüs (2. etapp).

Arvesse tuleb võtta samalaadse struktuuriga kemikaalidega tehtud katsete tulemusi, kui selliseid katseid on tehtud. Kui samalaadse struktuuriga ainete või selliste ainete segude kohta on olemas piisavad inimeste ja/või loomadega saadud andmed, mis võimaldavad määrata silmi söövitava/ärritava toime, siis võib eeldada, et uuritav kemikaal põhjustab samasuguseid reaktsioone. Sellistel juhtudel võib puududa vajadus kemikaaliga katseid teha. Järjestikuste katsete tegemise strateegia puhul ei ole negatiivsed tulemused, mis on saadud samalaadse struktuuriga ainete või selliste ainete segudega tehtud katsetest, piisav tõend kemikaali ärritava/söövitava toime puudumise kohta. Kemikaali võimaliku nahka ja silmi söövitava/ärritava toime määramiseks tuleb kasutada valideeritud ja heakskiidetud struktuuri-aktiivsuse seose analüüsi.

Füüsikalis-keemilised omadused ja keemiline reaktsioonivõime (3. etapp).

Kemikaalidel, millel on äärmuslik pH-väärtus, nagu $\leq$ 2,0 või $\geq$ 11,5, võib olla tugev paikne toime. Kui äärmuslik pH-väärtus on aluseks kemikaali määramisel silma söövitavaks või ärritavaks, siis võib arvesse võtta ka kemikaali puhvermahtuvust (puhverdusvõimet) (5–7). Kui puhverdusvõimest nähtub, et kemikaal ei saa olla silma söövitav (st kemikaal on äärmusliku pH-väärtuse ja väikese puhvermahtuvusega), tuleb selle kinnitamiseks teha täiendavaid katseid, kasutades eelistatult valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* ja *ex vivo* katseid (vt punkt 10).

Muu olemasoleva teabe arvesse võtmine (4. etapp).

Selles etapis tuleb hinnata kogu olemasolevat teavet süsteemse nahakaudse toksilisuse kohta. Samuti tuleb arvesse võtta uuritava kemikaali ägedat nahakaudset toksilisust. Kui on tõendatud, et uuritav kemikaal on naha kaudu kokkupuutel väga toksiline, siis võib puududa sellega silmakatsete tegemise vajadus. Kuigi

▼M7

ägeda nahakaudse toksilisuse ja silmade ärrituse/söövituse vahel ei ole tingimata seost, võib eeldada, et kui mõjur on kokkupuutel nahaga väga toksiline, on see väga toksiline ka silma sattumisel. Selliseid andmeid võib samuti arvesse võtta 2. ja 3. etapil.

Kemikaali nahka söövitava toime hindamine, kui see on nõutav ka regulatiivsel eesmärgil (5. etapp).

Nahka söövitava ja tugevalt ärritava toime võimalikkust tuleb kõigepealt hinnata kooskõlas katsemeetodiga B.4 (4) ja sellele lisatud täiendmaterjaliga (8), mis hõlmavad valideeritud ja rahvusvaheliselt heakskiidetud *in vitro* nahasöövituse katsemeetodite kasutamist (9–11). Kui kemikaali suhtes tehakse kindlaks, et see põhjustab nahasöövitust või tugevat nahaärritust, siis võib seda pidada ka silmi söövitavaks või tugevalt ärritavaks. Seega ei ole täiendavaid katseid vaja teha. Kui kemikaal ei ole nahka söövitav ega tugevalt ärritav, tuleb teha *in vitro* või *ex vivo* silmakatse.

In vitro või *ex vivo* katsete tulemused (6. etapp).

Kemikaali, millel on tuvastatud söövitavaid või tugevalt ärritavaid omadusi *in vitro* või *ex vivo* katses (12, 13), mis on spetsiaalselt valideeritud ja heakskiidetud silma ärrituse/söövituse hindamiseks, ei ole vaja katsetada loomadel. Võib eeldada, et sellistel kemikaalidel on sarnane raske toime *in vivo*. Kui valideeritud ja heakskiidetud *in vitro / ex vivo* katsed ei ole kättesaadavad, tuleks 6. etapp vahele jätta ning jätkata vahetult 7. etapiga.

In vivo katse küülikutega (7. ja 8. etapp).

In vivo silmakatseid alustatakse eelkatsega, milles kasutatakse ühte looma. Kui selle katse tulemustest nähtub, et kemikaal on silma söövitav või tugevalt ärritav, siis täiendavaid katseid ei tehta. Kui sellest katsest ei nähtu ühtki söövitavat ega tugevalt ärritavat toimet, tehakse kinnitav katse kahe lisaloomaga. Sõltuvalt kinnitava katse tulemustest võib vajalikuks osutuda täiendavate katsete tegemine. [vt katsemeetod B.5]

▼M7

KATSETE TEGEMISE JA HINDAMISE STRATEEGIA SILMA ÄRRITUSE/SÖÖVITUSE JAOKS

	Tegevus	Tulemus	Järeldus
1	Olemasolevad andmed inimese ja/või loomade kohta ja/või valideeritud ja rahvusvaheliselt heakskiidetud meetoditega saadud *in vitro* andmed, millest nähtub toime silmadele	Raske silmakahjustus	Lõppnäitaja; käsitatakse silmi söövitavana. Katseid ei ole vaja teha.
		Silmi ärritav toime	Lõppnäitaja; käsitatakse silmi ärritavana. Katseid ei ole vaja teha.
		Silmi söövitav/ärritav toime puudub	Lõppnäitaja; käsitatakse silmi mittesöövitava ja mitteärritavana. Katseid ei ole vaja teha.
	Olemasolevad andmed inimese ja/või loomade kohta ja/või valideeritud ja rahvusvaheliselt heakskiidetud meetoditega saadud *in vitro* andmed, millest nähtub nahka söövitav toime	Nahka söövitav toime	Eeldatakse, et on silmi söövitav. Katseid ei ole vaja teha.
	Olemasolevad andmed inimese ja/või loomade kohta ja/või valideeritud ja rahvusvaheliselt heakskiidetud meetoditega saadud *in vitro* andmed, millest nähtub nahka tugevalt ärritav toime	Tugev nahka ärritav toime	Eeldatakse, et on silmi ärritav. Katseid ei ole vaja teha.
	↓		
	Teave puudub või olemasolev teave ei ole lõplik.		
	↓		
2	Silma söövituse/ärrituse uurimiseks tehakse struktuuri-aktiivsuse seose analüüs (SAR).	Prognoositav raske silmakahjustus	Eeldatakse, et on silmi söövitav. Katseid ei ole vaja teha.
		Prognoositav silmi ärritav toime	Eeldatakse, et on silmi ärritav. Katseid ei ole vaja teha.
	Võetakse arvesse nahasöövituse uurimise SARi.	Prognoositav nahka söövitav toime	Eeldatakse, et on silmi söövitav. Katseid ei ole vaja teha.
	↓		
	Toime ei ole prognoositav või prognoos ei võimalda lõplikke järeldusi või on negatiivne.		
	↓		
3	Mõõta pH (puhvermahtuvus, kui asjakohane)	pH ≤ 2 või ≥ 11,5 (suure puhvermahtuvusega, kui asjakohane)	Eeldatakse, et on silmi söövitav. Katseid ei ole vaja teha.
	↓		
	2< pH < 11,5 või pH ≤ 2,0 või ≥11,5 (puhvermahtuvus on väike või puudub, kui asjakohane)		
	↓		
4	Arvestatakse nahakaudse süsteemse toksilisuse olemasolevaid andmeid.	Väga toksiline kontsentratsioonides, mida kasutatakse silmakatsetes.	Kemikaal oleks katsetamiseks liiga toksiline. Katseid ei ole vaja teha.

▼M7

	Tegevus	Tulemus	Järeldus
	↓		
	Selline teave ei ole kättesaadav või ei ole kemikaal väga toksiline.		
	↓		
5	Kui see on nõutav ka regulatiivsel eesmärgil, hinnatakse nahka söövitava toime võimalikkust käesoleva lisa peatükis B.4 esitatud katsetamisstrateegia alusel.	Söövitus või tugev ärritusreaktsioon	Eeldatakse, et on silmi ärritav. Lisakatseid ei ole vaja teha.
	↓		
	Kemikaal ei ole nahka söövitav või tugevalt ärritav.		
	↓		
6	Tehakse valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* silmakatsed.	Söövitus või tugev ärritusreaktsioon	Eeldatakse, et on silmi söövitav või tugevalt ärritav, kui tehtud katse on kasutatav söövitava / tugevalt ärritava toimega kemikaalide tuvastamiseks ja kui uuritav kemikaal on katse kohaldamise valdkonnas. Lisakatseid ei ole vaja teha.
		Ärritusreaktsioon	Eeldatakse, et on silmi ärritav, eeldusel et tehtud katse(d) on kasutatav(ad) söövitavate kemikaalide, tugevalt ärritava toimega ja ärritava toimega kemikaalide nõuetekohaseks tuvastamiseks ja et uuritav kemikaal on katse(te) kohaldamise valdkonnas. Lisakatseid ei ole vaja teha.
		Ärrituseta kulgev reaktsioon	Eeldatakse, et ei ole silmi ärritav, kui tehtud katse(d) on kasutatav(ad) ärritava toimega ja tugevalt ärritava toimega kemikaalide ning silmi söövitavate kemikaalide nõuetekohaseks tuvastamiseks ja kui uuritav kemikaal on katse(te) kohaldamise valdkonnas. Lisakatseid ei ole vaja teha.
	↓		
	Valideeritud ja heakskiidetud in vitro või ex vivo silmakatset/-katseid ei saa järelduse tegemiseks kasutada.		
	↓		

▼M7

	Tegevus	Tulemus	Järeldus
7	Eelkatse tehakse *in vivo* silmakatsena ühel küülikul.	Raske silmakahjustus	Käsitatakse silmi söövitavana. Lisakatseid ei ole vaja teha.
	↓		
	Rasket kahjustust ei esine või reaktsioon puudub.		
	↓		
8	Tehakse kinnitav katse, kasutades ühte või kahte lisalooma.	Söövitav või ärritav	Käsitatakse silmi söövitava või ärritavana. Lisakatseid ei ole vaja teha.
		Ei ole söövitav ega ärritav	Käsitatakse silmi mitte ärritava ja mitte söövitavana. Lisakatseid ei ole vaja teha.

KIRJANDUS

(1) OECD (1996), *OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods*, Solna, Rootsi, 22.–24. jaanuar 1996, (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998), *Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals*, November 1998, (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H., (1999), „A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies“. ATLA 27, 161–177.

(4) Käesoleva lisa peatükk B.4, „Äge nahaärritus/-söövitus“.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H., (1988), „Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals“, *Toxicol. In Vitro*, 2, 19–26.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K, Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M., (1998), „The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team“. *Toxicol. in vitro* 12, 483–524.

(7) Neun, D.J. (1993), „Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH“. *J.Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227–231.

(8) Käesoleva lisa peatüki B.4 täiendmaterjal, „Järjestikuste katsete tegemise strateegia nahaärrituse ja -söövituse uurimiseks“.

(9) Käesoleva lisa peatükk B.40, „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmine“.

(10) Käesoleva lisa peatükk B.40bis, „Nahasöövituskatse *in vitro:* katse inimnaha mudeliga“.

(11) OECD (2006), „*Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*“, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*, OECD, Paris.

▼**M7**

(12) Käesoleva lisa peatükk B.47, „Veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega“.

(13) Käesoleva lisa peatükk B.48, „Isoleeritud kanasilma katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega“.

▼B

B.6. **NAHA SENSIBILISEERIMINE**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Märkused

Katsete tundlikkust ja võimet tuvastada inimeste naha võimalikke sensibiliseerijaid loetakse inimese tervisega seotud toksilisuse liigitamise seisukohalt oluliseks.

Ei ole olemas uurimismeetodit, mis identifitseeriks adekvaatselt kõik ained, mis võivad inimese nahka sensibiliseerida ja mis sobiks kõikide ainete puhul.

Katse valimisel tuleb kaaluda aine füüsikalisi omadusi, sealhulgas aine võimet tungida läbi naha.

Välja on töötatud kahte liiki katsed, milles kasutatakse merisigu: abiainega katsed, milles võimendatakse allergiaseisundit sellega, et uuritavat ainet lahustatakse või suspendeeritakse Freundi täielikus abiaines *(Freund's Complete Adjuvant* – FCA), ja abiaineta katsed.

Abiainega katsed on tõenäoliselt konkreetse aine võimaliku nahka sensibiliseeriva toime ennustamisel täpsemad kui need meetodid, mis ei kasuta Freundi täielikku abiainet, ning seega tuleks selliseid meetodeid eelistada.

Merisigade maksimeerimise katse (GPMT) on laialdaselt kasutatud abiainega katse. Olgugi, et on olemas mitmeid meetodeid, millega on võimalik tuvastada aine potentsiaali kutsuda esile naha sensibiliseeriv reaktsioon, loetakse GPMT katset eelistatud abiainega katseks.

Paljude keemiliste ainete klasside puhul peetakse abiaineta katseid (millest eelistatakse Buehleri katset) vähem tundlikuks.

Teatavatel juhtudel võib Buehleri katse valimine olla põhjendatud, kuna selles katses manustatakse aine paikselt, mitte nahasisese süstimise teel nagu GPMT puhul. Buehleri katse kasutamist tuleks teaduslikult põhjendada.

Käesolevas meetodis kirjeldatakse GPMTd ja Buehleri katset. Kasutada võib ka teisi meetodeid tingimusel, et need on hästi valideeritud ja teaduslikult põhjendatud.

Kui tunnustatud sõelkatsega saadakse positiivne tulemus, võib uuritava aine määrata võimalikuks sensibiliseerijaks ning täiendava meriseakatse tegemine ei pruugi olla vajalik. Kui sellisel katsel on siiski negatiivne tulemus, tuleb meriseakatse teha käesolevas uurimismeetodis kirjeldatud korras.

Vt ka üldise sissejuhatuse B osa.

▼B

1.2. MÕISTED

Naha sensibiliseerimine – (allergiline kontaktne dermatiit) on mingi aine poolt põhjustatud immunoloogiliselt vahendatud nahareaktsioon. Inimestel võib vastureaktsiooniks olla sügelemine, punetus, paistetus, paapulid, vesivillid või nende kombinatsioon. Teiste liikide puhul võivad reaktsioonid erineda ning esineda võib ainult punetust ja paistetust.

Induktsioonkokkupuude – katsealuse kokkupuude uuritava ainega, mille eesmärk on kutsuda esile ülitundlik seisund.

Induktsiooniperiood – pärast induktsioonkokkupuudet vähemalt nädal aega kestev periood, mille ajal võib kujuneda ülitundlik seisund.

Allergilise reaktsiooni esile kutsuv kokkupuude – eelnevalt käsitletud katsealuse kokkupuude uuritava ainega pärast induktsiooniperioodi selleks, et määrata kindlaks, kas katsealune reageerib ülitundlikult.

1.3. VÕRDLUSMATERJAL

Kasutatud uurimismeetodi tundlikkust ja usaldusväärsust tuleks hinnata kord kuue kuu jooksul, kasutades selleks aineid, mille puhul on teada, et neil on nõrga või keskmise toimega nahka sensibiliseerivad omadused.

Nõuetekohaselt tehtud abiainega katses peaks eeldatavasti reageerima vähemalt 30 % ja abiaineta katses vähemalt 15 % nõrga või keskmise toimega sensibiliseerijat.

Eelistatakse järgmisi aineid:

CASi number	EINECSi number	EINECSi nimed	Üldnimetused
101-86-0	202-983-3	α-heksüülkaneelaldehüüd	α-heksüülkaneelaldehüüd
149-30-4	205-736-8	bensotiasool-2-tiool (merkaptobensotiasool)	kaptaks
94-07-7	202-303-5	bensokaiin	nordkaiin

Teatavas olukorras võib piisavate põhjenduste korral kasutada ka teisi eespool nimetatud kriteeriumidele vastavaid võrdlusaineid.

1.4. UURIMISMEETODI PÕHIMÕTE

Katseloomad puutuvad uuritava ainega esimest korda kokku nahasisese süstimise ja/või nahale määrimise kaudu (induktsioonkokkupuude). Pärast 10–14päevast puhkeaega (induktsiooniperioodi), mille jooksul võib välja kujuneda immuunsusreaktsioon, puutuvad loomad kokku nakatumist esile kutsuva doosiga. Katseloomade naha reaktsiooni määra ja ulatust võrreldakse võrdlusloomade omaga, kes saavad induktsiooni ajal platseeboravi ning kellele seejärel manustatakse nakatumist esile kutsuv doos.

1.5. UURIMISMEETODI KIRJELDUS

Kui uuritava aine eemaldamist peetakse vajalikuks, tuleks seda teha vee või sobiva lahustiga, ilma et see muudaks olemasolevat reaktsiooni või kahjustaks naha pinda.

▼B

1.5.1. *Merisigade maksimeerimise katse (GPMT)*

1.5.1.1. Valmistised

Terveid albiinomerisigu harjutatakse laboritingimustega vähemalt viie päeva jooksul enne katse tegemist. Enne katse tegemist jagatakse loomad juhuslikkuse alusel katserühmadesse. Karvad eemaldatakse sõltuvalt kasutatavast uurimismeetodist lõikamise, raseerimise või vajaduse korral keemilise depilatsiooni teel. Tuleb olla ettevaatlik, et vältida naha hõõrdumist. Loomi kaalutakse enne katse algust ning katse lõpus.

1.5.1.2. Katsetingimused

1.5.1.2.1. Katseloomad

Katseloomadena kasutatakse üldkasutatavate albiinomerisigade laboratoorseid aretusliine.

1.5.1.2.2. Arv ja sugu

Kasutada võib isas- ja/või emasloomi. Kui kasutatakse emasloomi, peaksid nad olema nullpaarid ja nad ei tohiks olla tiined.

Katserühmas on vähemalt kümme looma ning võrdlusrühmas vähemalt viis looma. Kui katserühmas ja võrdlusrühmas on kasutatud vastavalt vähem kui 20 ja kümmet merisiga ning kui ei ole võimalik järeldada, et uuritav aine on sensibilisaator, soovitatakse tungivalt täiendavate loomad uurimist, et kokku oleks vähemalt 20 katse- ja kümme võrdluslooma.

1.5.1.2.3. Doositasemed

Uuritava aine kontsentratsioon peaks iga induktsioonkokkupuute kohta olema süsteemselt hästi talutav ning kasutada tuleks kõrgeimat kerget kuni keskmist nahaärritust tekitavat kontsentratsiooni. Nakatumist esile kutsuva doosi puhul kasutatav kontsentratsioon peaks olema suurim ärritust mitte esile kutsuv doos. Vajaduse korral võib vajalikud kontsentratsioonid määrata kindlaks kahe või kolme loomaga tehtud prooviuuringute põhjal. Sellisel juhul tuleks kaaluda selliste loomade kasutamist, kellele on ainet manustatud FCA abil.

1.5.1.3. Katse käik

1.5.1.3.1. Induktsioon

Katserühma 0-päev

Abaluude piirkonda, kust on eemaldatud karvad, süstitakse naha alla 3 × 2 korda 0,1 ml selliselt, et kolm süsti tehakse keskjoonest vasakule ja kolm keskjoonest paremale.

Injektsioon 1: 1:1 segu (v/v) FCAst ja veest või füsioloogilisest keedusoolalahusest

Injektsioon 2: valitud kontsentratsiooniga uuritav aine sobivas vehiikelis

Injektsioon 3: valitud kontsentratsiooniga uuritav aine 1:1 segus (v/v) FCAst ja veest või füsioloogilisest keedusoolalahusest

Injektsioonis 3 lahustatakse vees lahustuvad ained vesifaasis enne FCAga segamist. Rasvades lahustuvad või lahustumatud ained suspendeeritakse FCAs enne vesifaasiga segamist. Uuritava aine lõppkontsentratsioon peab olema võrdne sellega, mida on kasutatud injektsioonis 2.

▼B

Injektsioonid 1 ja 2 tehakse lähestikku ning peale kõige lähemale, samal ajal kui injektsioon 3 tehakse piirkonna kõige tagapoolsemasse osasse.

Võrdlusrühma 0-päev

3 × 2 korda 0,1 ml süstitakse naha alla samadesse kohtadesse kui katseloomade puhul.

Injektsioon 1: 1:1 segu (v/v) FCAst ja veest või füsioloogilisest keedusoolalahusest

Injektsioon 2: lahjendamata vehiikel

Injektsioon 3: 50 %line w/v segu vehiikelit FCA ja vee või füsioloogilise keedusoolalahuse segus 1:1 (v/v).

Katse- ja võrdlusrühma 5.–7. päev

Kui aine ei ärrita nahka, manustatakse katsepinda ligikaudu 24 tundi enne paikset induktsioonkokkupuudet ja pärast karvade lõikamist ja/või raseerimist 0,5 ml 10 %list naatriumlaurüülsulfaati vaseliinis kohaliku ärrituse tekitamiseks.

Katserühma 6.–8. päev

Katsepiirkond puhastatakse uuesti karvadest. Sobivas vehiikelis oleva uuritava ainega täielikult küllastatud filterpaber (2 × 4 cm) asetatakse katsepiirkonnale ning kaetakse 48 tunniks oklusioonmähisega. Vehiikeli valikut tuleb põhjendada. Tahked ained pulbristatakse peeneks ja lisatakse sobivasse vehiikelisse. Vedelikke võib kasutada vajaduse korral lahjendamata kujul.

Võrdlusrühma 6.–8. päev

Katsepiirkond puhastatakse uuesti karvadest. Vehiikel asetatakse samal viisil uuritava ainega katsepiirkonnale ja kaetakse 48 tunniks oklusioonmähisega.

1.5.1.3.2. Nakatumise esilekutsumine

Katse- ja võrdlusrühma 20.–22. päev

Katserühma ja võrdlusrühma loomade küljed puhastatakse karvadest. Uuritava ainega immutatud lapp või uuritavat ainet sisaldav nõu pannakse looma ühele küljele ja vajaduse korral võib teisele küljele panna vehiikeliga immutatud lapi või seda sisaldava nõu. Lappe hoitakse oklusioonmähisega 24 tundi naha vastas.

1.5.1.3.3. Vaatlus ja hindamine: katse- ja võrdlusrühm

— Umbes 21 tundi pärast lapi äravõtmist nakatatud ala puhastatakse, pügatakse ja/või raseeritakse ning vajaduse korral depileeritakse.

— Umbes 3 tundi hiljem (umbes 48 tundi pärast nakatumise esilekutsumise alustamist) vaadeldakse naha reaktsiooni ning see registreeritakse liites esitatud hindamisskaala põhjal.

— Umbes 24 tundi pärast vaatlust tehakse teine vaatlus (72 tunni pärast) ning tulemused märgitakse üles.

Soovitav on hinnata katse tulemusi pimemeetodiga.

Kui esimese nakatumist esile kutsuva katse tulemusi on vaja täpsustada, tuleks kaaluda vajaduse korral uue võrdlusrühmaga teise nakatumist esile kutsuva katse (st taasnakatumise katse) tegemist umbes nädal pärast esimest katset. Taasnakatumise katse võib teha ka esialgse võrdlusrühmaga.

▼B

Vaadelda tuleks kõiki nahareaktsioone ja ebatavalisi leidusid, sealhulgas induktsioonist ja nakatumise esilekutsumisest tulenevaid süsteemseid reaktsioone, ja need tuleks üles märkida Magnussoni/-Klingmani (vt liidet) hindamisskaala alusel. Muude toimingute puhul, nt histopatoloogiline uuring, võib küsitavate mõjude täpsustamiseks mõõta nahavoldi paksust.

1.5.2. *Buehleri katse*

1.5.2.1. Valmistised

Terveid albiinomerisigu harjutatakse laboritingimustega vähemalt viie päeva jooksul enne katse tegemist. Enne katse tegemist jagatakse loomad juhuslikkuse alusel katserühmadesse. Karvad eemaldatakse sõltuvalt kasutatavast uurimismeetodist lõikamise, raseerimise või vajaduse korral keemilise depilatsiooni teel. Tuleb olla ettevaatlik, et vältida naha hõõrdumist. Loomi kaalutakse enne katse algust ning katse lõpus.

1.5.2.2. Katsetingimused

1.5.2.2.1. Katseloomad

Katseloomadena kasutatakse üldkasutatavate albiinomerisigade laboratoorseid aretusliine.

1.5.2.2.2. Arv ja sugu

Kasutada võib isaseid ja/või emaseid loomi. Kui kasutatakse emasloomi, peaksid nad olema nullpaarid ja nad ei tohiks olla tiined.

Katserühmas on vähemalt 20 looma ning võrdlusrühmas vähemalt kümme looma.

1.5.2.2.3. Doositasemed

Uuritava aine kontsentratsioon iga induktsioonkokkupuute kohta peaks olema kõrgeim kontsentratsioon, mis kutsub esile kerge, kuid mitte ülemäärase ärrituse. Nakatumist esile kutsuva doosi puhul kasutatav kontsentratsioon peaks olema suurim ärritust mitte esile kutsuv doos. Vajaduse korral võib vajalikud kontsentratsioonid määrata kindlaks kahe või kolme loomaga tehtava prooviuuringute põhjal.

Vees lahustuvate uuritavate ainete puhul on vehiikelina asjakohane kasutada vett või lahjendatud mitteärritavat pindaktiivse aine lahust. Teiste uuritavate ainete vehiikeliks sobib induktsioonkokkupuute 80 %line etanooli ja vee lahus ning nakatumise esilkutsumise puhul atsetoon.

1.5.2.3. Analüüsi käik

1.5.2.3.1. Induktsioon

Katserühma 0-päev

Üks külg puhastatakse korralikult karvadest. Katselapp peab olema sobivas vehiikelis uuritava ainega põhjalikult immutatud (vehiikeli valikut tuleks põhjendada; vedelaid uuritavaid aineid võib vajaduse korral kasutada lahjendamata kujul).

Katselapid pannakse katsepiirkonda ning hoitakse kuus tundi oklusioonlapi või uuritavat ainet sisaldava nõu ja sobiva mähisega naha peal.

▼B

Katselapid peavad olema oklusiivsed. Kasutamiseks sobib umbes 4–6 cm^2 suurune puuvillalapike ning see võib olla ümmargune või kandiline. Oklusiooni tagamiseks soovitatakse sobivat kinnitusmehhanismi. Mähise kasutamisel võib olla vaja täiendavat kokkupuudet.

Võrdlusrühma 0-päev

Üks külg puhastatakse korralikult karvadest. Vehiikel asetatakse katsepinnale samal viisil kui katserühma puhul. Katselappe hoitakse kuus tundi oklusioonlapi või uuritavat ainet sisaldava nõuga ja sobiva mähisega naha peal. Kui on võimalik tõestada, et platseeboravi saavat võrdlusrühma ei ole vaja, võib kasutada varem kasutamata võrdlusrühma.

Katse- ja võrdlusrühma 6.–8. ja 13.–15. päev

Samas katsepiirkonnas, 6.–8. ja siis 13.–15. päevaga samal küljel viiakse läbi samasugune kokkupuude nagu 0-päeval (vajaduse korral puhastatakse nahk karvadest).

1.5.2.3.2. Nakatumise esilekutsumine

Katse- ja võrdlusrühma 27.–29. päev

Katserühma ja võrdlusrühma loomade külg, mis ei ole seni uuritava ainega kokkupuutes olnud, puhastatakse karvadest. Oklusioonlapp või nõu, milles on piisaval määral kõrgeima mitteärritava kontsentratsiooniga uuritavat ainet, pannakse katse- ja võrdlusrühma loomade selle külje tagaosale, millel ei ole veel katset tehtud.

Vajaduse korral pannakse katse- ja võrdlusrühma loomade töötlemata külje tagaosale vehiikelit sisaldav oklusioonlapp või -nõu. Neid lappe või nõusid hoitakse sobiva mähisega kuus tundi naha vastas.

1.5.2.3.3. Vaatlus ja hindamine

— Umbes 21 tundi pärast lapi äravõtmist puhastatakse karvadest ala, millel nakatumine esile kutsuti.

— Umbes kolm tundi hiljem (umbes 30 tundi pärast nakatumist esile kutsuva lapi katsepiirkonda asetamist) vaadeldakse nahareaktsioone ning need märgitakse üles vastavalt liites esitatud hindamisskaalale.

— Umbes 24 tundi pärast 30 tundi kestnud vaatlusperioodi (umbes 54 tundi pärast nakatumist esile kutsuva lapi nahapinnale asetamist) vaadeldakse nahareaktsioone uuesti ning tulemused märgitakse üles.

Katse tulemusi tuleks hinnata soovitatavalt pimemeetodiga.

Kui esimese nakatumist esile kutsuva katse tulemusi on vaja täpsustada, tuleks kaaluda vajaduse korral uue võrdlusrühmaga teise nakatumist esile kutsuva katse (st taasnakatumise katse) tegemist umbes nädal pärast esimest katset. Taasnakatumise katse võib teha ka esialgse võrdlusrühmaga.

▼B

Kõiki nahareaktsioone ja ebatavalisi leidusid, sealhulgas induktsioonist ja nakatumise esilekutsumisest tulenevaid süsteemseid mõjusid, tuleks vaadelda ja need tuleks üles märkida Magnussoni/Klingmani (vt liidet) hindamisskaala alusel. Muude toimingute puhul, nt histopatoloogiline uuring, võib küsitavate mõjude täpsustamiseks mõõta nahavoldi paksust.

2. **ANDMED (GPMT ja Buehleri katse)**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtvalt tabelis, milles oleks iga looma kohta märgitud kõikidel vaatlustel täheldatud nahareaktsioonid.

3. **ARUANDLUS (GPMT ja Buehleri katse)**

Kui enne merisigade maksimeerimise katset tehakse sõeluuring, tuleb koos katse- ja võrdlusrühmaga saadud tulemustega esitada ka katse (nt paikne lümfisõlmede uuring (LLNA), hiire kõrva turse määratlemise katse (MEST)) kirjeldus või viide sellele, sealhulgas meetodi üksikasjad.

Katsearuanne (GMPT ja Buehleri katse)

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet.

Katseloomad:

— kasutatud merisea aretusliin;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, toit jne;

— iga looma kaal katse alguses.

Katsetingimused:

— lapi asetuskoha ettevalmistamise meetod;

— lapi materjali ja lappide asetamise meetodi üksikasjad;

— prooviuuringu tulemused ning järeldused katses kasutatavate induktsiooni- ja nakatumist esile kutsuvate kontsentratsioonide kohta;

— uuritava aine ettevalmistamise, kasutamise ja eemaldamise üksikasjad;

— vehiikeli valiku põhjendus;

— induktsioonkokkupuutes ja nakatumise esilekutsumisel kasutatud vehiikeli ja uuritava aine kontsentratsioonid ning induktsiooni ja nakatumise esilekutsumise ajal kasutatud aine kogumäär.

Tulemused:

— kokkuvõte kõige värskemate tundlikkuse ja usaldusväärsuse kontrollide tulemuste kohta (vt 1.3), sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja vehiikeli kohta;

▼B

— iga looma kohta, sealhulgas hindamissüsteem;

— täheldatud toime iseärasuse ja määra kirjeldus;

— histopatoloogilised leiud.

Tulemuste üle arutlemine.

Järeldused.

4. **VIITED**

Käesolev meetod on analoogne meetodiga OECD TG 406.

▼B

Liide

TABEL

Magnussoni/Kligmani hindamisskaala mähiskatsega esilekutsutava reaktsiooni hindamiseks

0 = nähtavat muutust ei esine

1 = juhuslik või laiguline punetus

2 = mõõdukas ja kokkuvalgunud punetus

3 = intensiivne punetus ja paistetus

▼M4

B.7. SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 28-PÄEVANE UURING NÄRILISTEL

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 407 (2008). Esialgne TG 407 võeti vastu 1981. aastal. 1995. aastal võeti vastu läbivaadatud versioon, et saada uuringus kasutatud katseloomalt lisateavet, eelkõige neurotoksilisuse ja immuuntoksilisuse kohta.

2. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (8). Selle tegevuse üks osa on olemasoleva OECD juhendi „Suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevane uuring närilistel" (TG 407) ajakohastamine selliste näitajate lisamiseks, millega saab määrata uuritavate kemikaalide sisesekretsioonisüsteemi kahjustavat toimet. Ajakohastamiseks viidi ellu laialdane rahvusvaheline programm, et katsetada täiendavate näitajate asjakohasust ja kasutatavust, osutatud näitajate sobivust kemikaalide puhul, millel on (anti)östrogeenne, (anti)androgeenne ja (anti)türoidne toime, laborisisest ja laboritevahelist korratavust ning uute näitajate ja varasema TG 407 kohaselt nõutud näitajate vastastikust mõju. Niimoodi saadud suur hulk andmeid on kokku võetud põhjalikus OECD aruandes (9), milles andmeid on ka üksikasjalikult hinnatud. Käesolev ajakohastatud katsejuhend B.7 (mis on samaväärne katsejuhendiga TG 407) on välja töötatud rahvusvahelise uurimisprogrammi käigus saadud tulemuste ja kogemuste alusel. Käesolev katsemeetod võimaldab seada teatavad endokriinsüsteemi kaudu põhjustatavad toimed muude toksikoloogiliste mõjude konteksti.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

3. Kemikaali toksiliste omaduste kindlaksmääramisel ja hindamisel võib teha suukaudse mürgisuse katseid kordusdoosidega pärast seda, kui on saadud esialgne teave mürgisuse kohta ägeda mürgisuse katsetest. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on uurida mürgisust, mille põhjuseks on väga mitmesugustele võimalikele mürgisuse sihtsüsteemidele avaldatav toime. Sellega saadakse teavet võimalike terviseohtude kohta, mis võivad tekkida korduval kokkupuutel suhteliselt piiratud ajavahemiku jooksul ja mis hõlmavad mõju närvisüsteemile, immuunsüsteemile ja sisesekretsioonisüsteemile. Seoses nende konkreetsete eesmärkidega peaks käesoleva meetodiga olema võimalik kindlaks teha võimalikke neurotoksilisi kemikaale, mida tuleb sellest aspektist edaspidi veel süvendatult uurida, ja kemikaale, mis mõjutavad kilpnäärme talitlust. Meetodiga võib saada andmeid ka kemikaalide kohta, mis mõjutavad mees- ja/või naissuguelundeid noortel täiskasvanud loomadel, samuti nende kemikaalide immunoloogilise toime kohta.

4. Käesoleva katsemeetodiga B.7 saadud tulemusi tuleks kasutada ohtude kindlakstegemiseks ja riskide hindamiseks. Sisesekretsioonisüsteemi iseloomustavate näitajate kaudu saadud tulemuste käsitlemisel tuleks arvestada „OECD kontseptuaalset raamistikku sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide katsetamiseks ja hindamiseks" (11). Meetod kujutab endast põhilist kordusdoosi toksilisuse uurimise meetodit, mida võib kasutada kemikaalide korral, mille puhul 90-päevane uuring ei ole põhjendatud (näiteks kui tootmismaht ei ületa teatavat piiri), või pikaajalist katset ettevalmistava uuringuna. Kokkupuute ajavahemik peaks olema 28 päeva.

▼**M4**

5. Nagu näitas rahvusvaheline programm, mis viidi ellu selliste parameetrite valideerimiseks, mis kõlbaksid uuritava kemikaali võimaliku sisesekretsioonisüsteemi häiriva mõju kindlakstegemiseks, sõltub käesoleva katsemeetodi B.7 tulemuste kvaliteet tugevasti sellest, kui kogenud on uurimislabor. See kehtib eriti emaslooma suguorganite tsükliliste muutuste histopatoloogilise määramise kohta ning selliste väikeste hormoonsõltuvate organite massi määramise kohta, mida on lahkamisel raske eraldada. On välja töötatud histopatoloogiaalane juhend (19). Juhend on kättesaadav OECD katsejuhendeid käsitleva avaliku veebisaidi kaudu. Juhendi eesmärk on aidata patoloogidel teha vaatlusi ja aidata suurendada katse tundlikkust. Sisesekretsioonisüsteemiga seotud toksilisuse kohta saab andmeid mitmesuguste näitajate kaudu, mida määratakse käesoleva katsemeetodiga. Näitajaid, mille kasulikkuse tõendamiseks ei olnud piisavalt andmeid või mille kohta valideerimisel selgus, et nende võime leida sisesekretsioonisüsteemi kahjustavaid kemikaale on vähe tõendatud, pakutakse vabal valikul kasutatavate näitajatena (vt 2. liide).

6. Valideerimise käigus saadud andmete põhjal tuleb rõhutada, et käesoleva katse tundlikkus ei ole piisav selleks, et teha kindlaks kõik ained, millel on (anti)östrogeenne või (anti)androgeenne toime (9). Käesolevat meetodit ei kasutata eluetapil, mis on sisesekretsioonisüsteemi mõjutamise suhtes kõige tundlikum. Valideerimisel võimaldas käesolev meetod siiski kindlaks teha aineid, mis nõrgalt või tugevasti mõjutavad kilpnäärme funktsiooni, ning tugeva ja mõõduka endokriinse toimega aineid, mis toimivad östrogeeni või androgeeni retseptorite kaudu, kuid enamikul juhtudest ei võimaldanud meetod kindlaks teha selliseid endokriinse aktiivsusega aineid, mis mõjutavad östrogeeni või androgeeni retseptoreid nõrgalt. Seepärast ei saa seda meetodit pidada endokriinse aktiivsuse leidmise sõeluuringu meetodiks.

7. Järelikult ei saa sellise toimeviisiga seotud mõju puudumist pidada tõendiks, et aine ei mõjuta sisesekretsioonisüsteemi. Sisesekretsioonisüsteemi kaudu avalduva mõju puhul ei tohiks aine iseloomustamisel toetuda üksnes käesolevale meetodile, vaid seda meetodit tuleks kasutada tõendite kaalumise lähenemisviisi raames ja aine võimaliku endokriinse aktiivsuse iseloomustamiseks võtta arvesse kõik kemikaali kohta olemas olevad andmed. Seepärast peaks õigusloomealaste otsuste tegemine endokriinse toime kohta (aine iseloomustamine) olema põhjendatud laiaulatuslikul alusel, mitte üksnes käesoleva katsemeetodi abil saadud andmetega.

8. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomade hooldamise kohalikele normidele; siin esitatud hoolduse ja kohtlemise kirjeldused on katse tegemise miinimumnõuded ning kui kohalikud eeskirjad on rangemad, tuleb lähtuda kohalikest eeskirjadest. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (14).

9. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

10. Uuritav kemikaal manustatakse katseloomade eri rühmadele suu kaudu kord päevas astmeliselt suurenevate doosidena selliselt, et üks rühm saaks 28 päeva jooksul ainult ühte doosi. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi iga päev hoolikalt toksilisuse märkide tuvastamiseks. Katse ajal surnud või humaansel viisil surmatud loomad lahatakse ning katse lõppemisel surmatakse humaansel viisil ja lahatakse ka ellujäänud loomad. 28-päevane katse annab teavet korduva suukaudse kokkupuute mõjude kohta ja

▼M4

katsest võib selguda, et on vaja korraldada pikemaid uuringuid. Samuti võib katse anda teavet pikemas uuringus kasutatavate kontsentratsioonide valimise kohta. Käesoleva katsemeetodiga saadud andmed peaksid võimaldama kirjeldada uuritava kemikaali mürgisust, koostada mõju doosist sõltuvuse ja määrata katseloomadele täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsiooni (*No-Observed Adverse Effect Level*, NOAEL).

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

11. Närilistest eelistatakse rotte, kuigi kasutada võib ka muid närilisi. Kui käesolevas katsemeetodis B.7 kirjeldatud näitajaid uuritakse mõne muu näriliseliigiga, tuleb seda üksikasjalikult põhjendada. Kuigi bioloogiliselt on võimalik, et muu liik peaks mürgisele kemikaalile reageerima sarnaselt rotiga, võib väiksemate loomade kasutamisel suureneda tulemuste hajuvus, kuna väikseid organeid on tehniliselt keerukam eraldada. Sisesekretsioonisüsteemi häirivate kemikaalide kindlakstegemise rahvusvahelises valideerimisprogrammis kasutati ainsa liigina rotte. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Doseerimisega tuleks alustada võimalikult kohe pärast võõrutamist ja igal juhul enne loomade üheksanädalaseks saamist. Uuringu alguses peaks loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ega tohiks ületada ±20 % kummastki soost loomade keskmisest kehamassist. Kui suukaudse kordusdoosi uuringule järgneb pikaajaline uuring, tuleks mõlemas uuringus kasutada eelistatult samast aretusliinist ja sama päritoluga loomi.

Pidamis- ja söötmistingimused

12. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kohalikele normidele. Temperatuur katseloomade ruumis peab olema 22 °C (±3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavalist labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Söödavalikut võib mõjutada vajadus kindlustada sobiva lisasegu lisamine, kui uuritavat kemikaali manustatakse sellisel viisil. Loomi tuleks pidada puurides väikeste samast soost isendite rühmadena; kui see on teaduslikult põhjendatud, võib loomi pidada ka üksikpuurides. Rühmaviisilisel pidamisel ei tohiks puuris olla rohkem kui viis looma.

13. Sööta tuleb korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes. Sööda proov tuleb alles hoida kuni katseprotokolli lõpliku valmimiseni.

Loomade ettevalmistamine

14. Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad märgistatakse individuaalseks eristamiseks ning enne katse alustamist hoitakse neid vähemalt viis päeva puurides, et nad jõuaksid laboritingimustega kohaneda.

Dooside ettevalmistamine

15. Uuritav kemikaal manustatakse sundsöötmisega või koos sööda või joogiveega. Suukaudse manustamise meetod sõltub uuringu eesmärgist ja uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistest ja toksiko-kineetilistest omadustest.

▼M4

16. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. On soovitav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-suspensiooni (nt maisiõlis) kasutamist ja siis lahustamist mõnes muus võimalikus kandeaines. Kui kandeainena kasutatakse muud ainet peale vee, tuleb teada kandeaine toksilisusega seotud omadusi. Kindlaks tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

17. Igal doositasemel tuleks kasutada vähemalt kümmet looma (viis emas- ja viis isaslooma). Kui plaanitakse vahepealset loomade surmamist, tuleb isendite arvu suurendada vastavalt selle arvu võrra, kui palju loomi kavatsetakse surmata enne uuringu täielikku lõpetamist. Tuleb kaaluda täiendava kümnest loomast (viis kummastki soost) koosneva lisarühma (edaspidi: „satelliitrühm") kasutamist kontrollina ja suurima doosi rühmas, et jälgida mürgise toime pöörduvust, püsivust või mürgisuse avaldumist hilinemisega vähemalt 14 päeva jooksul pärast doseerimise lõppu.

Doseerimine

18. Üldiselt tuleks kasutada vähemalt kolme doosi- ja kontrollrühma, kuid kui muude andmete hindamise põhjal ei eeldata ühtegi mõju korduva doosiga 1 000 mg kg kehamassi kohta päevas, võib teha piirsisalduskatse. Kui sobivaid andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside kindlaksmääramise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse (kasutades sama liini ja päritoluga loomi). Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleb võrdlusrühmale manustada kandeainet suurimas kasutatud mahus.

19. Doositaseme valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellelaadsete kemikaalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Kõrgeim doositase tuleks valida nii, et see kutsuks esile toksilise toime, kuid ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Seejärel tuleks valida aste-astmelt vähenevad doositasemed, et näidata doosi ja toime vahelist seost ning kahjuliku toime puudumist madalaimal doositasemel ehk täheldatava kahjuliku toimeta doositasemel (NOAEL). Alanevate kontsentratsioonide valimisel on sageli parim viis kasutada kahe- kuni neljakordseid vahemikke ja väga suurte kontsentratsioonivahemike (nt üle kümnekordne tegur) kasutamise asemel on parem lisada neljas katserühm.

20. Täheldatava üldise toksilisuse puhul (nt kehamassi vähenemine, mõju maksale, südamele, kopsudele või neerudele jne) või muude muutuste puhul, mille põhjuseks ei tarvitse olla toksiline toime (näiteks isu halvenemine, maksa suurenemine), tuleks jälgitavaid mõjusid immuunsüsteemi, närvisüsteemi või sisesekretsioonisüsteemi näitajatele tõlgendada suure ettevaatusega.

Piirsisalduskatse

21. Kui käesolevas uuringus kirjeldatud meetodiga ei tuvastata katses päevadoosil vähemalt 1 000 mg kehamassi kg kohta või uuritava kemikaali protsentuaalselt sama suurel määral (määratud kehamassi alusel) sööda või joogivee kaudu manustamisel märkimisväärset toksilist mõju ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga kemikaalide kohta saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta täielikku kolme doositasemega uuringut vajalikuks. Võib teha piirsisalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

▼M4

Dooside manustamine

22. Loomadele doseeritakse uuritavat kemikaali seitsmel päeval nädalas 28 päeva jooksul. Kui uuritavat kemikaali manustatakse loomadele sundsöötmisega, tuleks seda teha ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Suurim vedelikukogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Maht ei tohiks ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kus võib kasutada mahtu 2 ml 100 g kehamassi kohta. Katsekoguse varieeruvust tuleks vähendada ja reguleerida kontsentratsioone nii, et doosi kogumaht oleks kõikide dooside korral sama; seda ei saa teha ärritavate või söövitavate kemikaalide puhul, mille mõju suurema kontsentratsiooni korral tavaliselt tugevneb.

23. Kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehamassile; tuleb täpsustada, millist võimalust kasutatakse. Kui kemikaali manustatakse sundsöötmisega, tuleks doos anda igal päeval samal ajal ning seda tuleks vajaduse korral kohandada, et säiliks püsiv doositase looma kehamassi suhtes. Kui pärast kordusdoosi uuringut tehakse pikaajaline uuring, tuleks mõlema uuringu puhul kasutada samasugust sööta.

Vaatlused

24. Jälgimise ajavahemik peaks olema 28 päeva. Satelliitrühma kuuluvaid loomi, keda vaadeldakse pikema aja jooksul, et teha kindlaks uuritava kemikaali toksilise toime hilinenud ilmnemist, toime püsimist või toimest toibumist, tuleks pidada veel vähemalt 14 päeva ilma uuritavat kemikaali manustamata.

25. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas, soovitatavalt iga kord samal ajal ning võttes arvesse kõige tõenäolisemat aega pärast doseerimist, mille jooksul oodatud mõju peaks olema kõige tugevam. Üles tuleks märkida loomade tervislik seisund. Vähemalt kaks korda päevas tuleks kontrollida, kas loomad on haigestunud või surnud.

26. Kõikide loomade puhul tuleks üksikasjalik kliiniline vaatlus teha enne seda, kui loomale esimest korda uuritavat kemikaali manustatakse (selleks, et loomi oleks võimalik omavahel võrrelda), ning seejärel vähemalt kord nädalas. Need vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, selleks ette nähtud kohas ja eelistatavalt iga kord samal kellaajal. Tulemused tuleks hoolikalt üles märkida, kasutades selleks võimaluse korral uurimislabori selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et katsetingimused varieeruksid võimalikult vähe ja eelistatult ei tohiks vaatlejad olla teadlikud uuritava kemikaali manustamisest. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised tunnused: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestal, eritiste esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus, muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad endaga ümberkäimisele reageerivad, kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi liikumine) (2).

27. Neljandal kokkupuutenädalal tuleks hinnata sensoorseid reaktsioone eri liiki ärritajatele (2) (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptiivsetele ärritajatele) (3, 4, 5), samuti haardetugevust (6) ja motoorset tegevust (7). Võimalike meetodite täpsemad üksikasjad on esitatud vastavates viidatud dokumentides. Siiski võib kasutada ka muid meetodeid kui need, millele viidatakse.

▼M4

28. Neljanda kokkupuutenädala funktsionaalsed vaatlused võib ära jätta juhul, kui uuring tehakse subkroonilise toksilisuse 90-päevase uuringu eeluuringuna. Sellisel juhul tuleks funktsionaalsed vaatlused teha kõnealuse järeluuringu käigus. Teiselt poolt võivad kordusdoosi uuringu käigus tehtud funktsionaalsete vaatluste andmed hõlbustada järgneva subkroonilise uuringu jaoks doositasemete valimist.

29. Erandkorras võib funktsionaalsed vaatlused ära jätta ka rühmade puhul, kellel esineb toksilisuse märke niisugusel määral, et see oluliselt takistab funktsionaalsete katsete tegemist.

30. Lahkamisel võiks tupeäiete abil määrata kõikide emasloomade innatsükli (valikuline). Sellistest andmetest saadakse teavet innatsükli järgu kohta looma surmamise ajal ja see aitab histoloogiliselt hinnata östrogeenitundlikke kudesid (vt histopatoloogia juhendid (19)).

Kehamass ja sööda/vee tarbimine

31. Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas. Sööda tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist samuti mõõta vähemalt kord nädalas.

Hematoloogia

32. Katseperioodi lõpus tuleks teha järgmised hematoloogilised uuringud: hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, retikulotsüütide arv, leukotsüütide üldarv ja eri leukotsüüdipopulatsioonide arvud, vereliistakute arv ja vere hüübimisaja/hüübimisvõime mõõtmine. Kui uuritav kemikaal või selle oletatavad metaboliidid on või võivad olla oksüdeerivate omadustega, tuleks teha veel muid määramisi, sealhulgas määrata methemoglobiini kontsentratsioon ja Heinzi kehakesed.

33. Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast vahetult enne loomade surmamist või selle ajal ja neid tuleks säilitada sobivates tingimustes. Enne surmamist tuleks loomi hoida üks öö söömata ([1]).

Kliiniline biokeemia

34. Kliinilised biokeemilised analüüsid peamiste toksiliste mõjude uurimiseks kudedes ja eelkõige toime uurimisel neerudele ja maksale tuleks teha vereproovidega, mis on võetud loomadelt vahetult enne surmamist või selle ajal (välja arvatud loomad, kes leiti suremas ja/või surmati katse ajal). Plasma- või seerumiuuringud peavad hõlmama naatriumi, kaaliumi, glükoosi, üldkolesterooli, karbamiidi, kreatiniini, üldvalgu ja albumiini, vähemalt kahe hepatotsellulaarsele toimele osutava ensüümi (näiteks alaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, leeliseline fosfataas, γ-glutamüültranspeptidaas, ja glutamaatdehüdrogenaas) ja sapphapete määramist. Muude ensüümide (maksa- või muud ensüümid) ja bilirubiini mõõtmised võivad teatavatel tingimustel anda kasulikku teavet.

35. Uuringu viimasel nädalal on loomadelt teatava aja jooksul teatava mahuga uriiniproovide kogumise teel võimalik teha järgmisi uriinianalüüse: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, valk, glükoos ja veri/vererakud.

([1]) Mitmete seerumi ja plasma, eelkõige glükoosi mõõtmiste korral oleks eelistatav loomadele eelneva öö jooksul süüa anda. Selle peamine põhjendus on see, et söötmise korral oleks tulemuste varieeruvus suurem ning see varjaks raskemini tuvastatava toime ning muudaks tõlgendamise raskeks. Teisest küljest võib öö läbi söötmata hoidmine aga häirida loomade tavalist üldist ainevahetust ja eelkõige söödaga manustamise uuringute puhul võib see häirida igapäevast kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Kui loomadele ei anta öö jooksul süüa, tuleks uuringu neljandal nädalal tehtud funktsionaalsete vaatluste järel teha kliinilis-biokeemilised määramised.

▼M4

36. Lisaks sellele tuleks kaaluda üldistele koekahjustustele osutavate plasma- või seerumimarkerite uurimist. Muud määramised, mis tuleks teha juhul, kui uuritava kemikaali teadaolevad omadused võivad mõjutada või mõjutavad eeldatavasti sellega seotud metaboliseerimise profiili, hõlmavad kaltsiumi, fosfaadi, triglütseriidide, teatavate hormoonide ja koliinesteraasi määramist. Need on vaja määrata teatud klassi kuuluvate kemikaalide puhul või iga juhtumi puhul eraldi.

37. Kuigi sisesekretsioonisüsteemi näitajate rahvusvahelise evalueerimisega ei õnnestunud näidata kilpnäärmehormoonide (T3, T4) ja TSH määramise selgeid eeliseid, võib siiski olla kasulik hoida alles plasma- ja seerumiproovid, et määrata T3, T4 ja (soovi korral) TSH, kui on andmeid, et võib esineda mõju ajuripatsi-kilpnäärme süsteemile. Neid proove võib säilitada külmutatult –20 °C juures. Hormoonide määramisel võivad hajuvust ja absoluutseid kontsentratsioone mõjutada järgmised tegurid:

— surmamise aeg, kuna hormoonide kontsentratsioonil on ööpäevane muutumise rütm;

— surmamisviis – tuleb vältida loomade tarbetut stressi, mis võib mõjutada hormoonide kontsentratsioone;

— hormoonide määramise testikomplektid, mille standardkõverad võivad olla erinevad.

Usaldusväärsemalt kui hormoonide taseme määramisega saab kilpnääret mõjutavaid kemikaale teha kindlaks histopatoloogilise analüüsiga.

38. Hormoonide määramiseks ette nähtud plasmaproovid tuleb saada enam-vähem ühel kellaajal. T3, T4 ja TSH määramist soovitatakse kaaluda siis, kui kilpnäärmes leitakse histopatoloogilise uuringuga muutusi. Müügilolevate eri testikomplektidega saadakse erinevad hormoonikontsentratsioonide arvväärtused. Järelikult ei tarvitse olla võimalik esitada kvaliteedinõudeid, mis põhineksid ühesugustel varasematel andmetel. Teise võimalusena peaksid laborid püüdma hoida hajuvuskoefitsiendid T3 ja T4 puhul allpool 25 ning TSH puhul allpool 35. Kõik kontsentratsioonid esitatakse ühikutes ng/ml.

39. Kui varasemad andmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate määramist enne doseerimise algust või määrata need loomadel, keda ei kasutata katserühmades.

PATOLOOGIA

Täielik lahkamine

40. Kõik uuringus kasutatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Kõikide loomade (välja arvatud need, kes leitakse surevana ja/või surmatakse uuringu ajal) maks, neerud, neerupealised, munandid, munandimanused, eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega tervikuna, harknääre, põrn, aju ja süda tuleb vajaduse korral puhastada muudest kudedest ja nende märgmass määratakse kuivamise vältimiseks võimalikult kiiresti pärast väljalõikamist. Eesnäärmekompleksi puhastamisel naaberkudedest tuleb hoolikalt vältida vedelikuga täidetud seemnepõiekeste vigastamist. Teise võimalusena võib seemnepõiekesed ja eesnäärme eraldada ja kaaluda pärast fikseerimist.

▼M4

41. Lisaks tuleks vajaduse korral ja kuivamise vältimiseks võimalikult kiiresti pärast väljalõikamist kaaluda veel kaks kude: munasarjade paar (märgmass) ja emakas, kaasa arvatud emakakael (juhendid emakakudede eemaldamiseks ja kaalumiseks ettevalmistamiseks on esitatud dokumendis OECD TG 440 (18)).

42. Kilpnäärme massi võib (soovi korral) määrata pärast fikseerimist. Ka siin tuleks väljalõikamine teha väga hoolikalt ja alles pärast fikseerimist, et vältida koe kahjustamist. Koe kahjustamine võib histopatoloogilise analüüsi nurjata.

43. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 47) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskkonnas: kõik silmaga täheldatavad vigastused, aju (olulised piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju, ajusild), seljaaju, silm, magu, peensool ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, neerud, neerupealised, põrn, süda, harknääre, kilpnääre, hingetoru ja kopsud (kopsud pumbatakse fiksaatorit täis ja pannakse fiksaatorisse), sugunäärmed (munandid ja munasarjad), suguelundid (emakas ja emakakael, munandimanused, eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega), tupp, kusepõis, lümfisõlmed (peale manustamiskohale kõige lähedasema lümfisõlme tuleks võtta teine lümfisõlm vastavalt labori oskustele (15)), perifeerne närv (istmiku- või sääreluu närv), mis on eelistatult lihase lähedal, skeletilihas ning luu koos luuüdiga (saadud lõikamisega või alternatiivselt värskelt imetud luuüdi). Munandid soovitatakse fikseerida sukeldamisega Bouini või muudetud Davidsoni fikseerimislahusesse (16, 17). *Tunica albuginea* tuleb elundi mõlemast otsast ettevaatlikult ja mitte sügavalt nõelaga läbi torgata, et fikseerimislahus saaks kiiresti sisse tungida. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid.

44. Sisesekretsiooniga seotud mõjude kohta võib väärtuslikke osundusi saada järgmiste kudede uurimisega: sugunäärmed (munasarjad ja munandid), suguelundid (emakas koos emakakaelaga, munandimanused, seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega, eesnäärme dorsolateraalne ja ventraalne osa), tupp, ajuripats, isaslooma rinnanääre, harknääre ja neerupealised. Muutusi isaslooma rinnanäärmetes ei ole piisavalt dokumenteeritud, kuid see näitaja võib olla väga tundlik östrogeense toimega kemikaalide suhtes. Soovi korral võib uurida ka organeid või kudesid, mida ei ole punktis 43 loetletud (vt 2. liide).

45. Histopatoloogia juhendis (19) on üksikasjaliselt esitatud lisateavet lahkamise, fikseerimise, väljalõikamise ja sisesekretsioonikudede histopatoloogia kohta.

46. Rahvusvahelise katsetusprogrammiga saadi mõningaid tõendeid, et suguhormoonide homeostaasi vähe mõjutavate kemikaalide nõrka endokriinset toimet võib kindlaks teha pigem mitmesuguste kudede ja östruse tsükli vahelise sünkronisatsiooni häirumise kaudu, mitte aga emassuguelundite selgete histopatoloogiliste muutuste kaudu. Kuigi sellise mõju kohta selgeid tõendeid ei saadud, soovitatakse tõendeid östruse tsükli võimaliku asünkroonsuse kohta võtta arvesse munasarjade (folliikulrakkude, teekarakkude ja granuloosrakkude), emaka, emakakaela ja tupe histopatoloogiliste muutuste tõlgendamisel. Kui tupeäietega määratakse ka tsükli faasi, võiks saadud tulemust selles võrdluses samuti arvestada.

▼M4

Histopatoloogia

47. Kõikide võrdlusrühma ja suure doosiga rühmade loomade säilitatud organeid ja kudesid tuleks histopatoloogiliselt põhjalikult uurida. Histopatoloogilised uuringud tuleks teha ka muude doosirühmade loomade puhul, kui suure doosi rühmas leitakse manustamisega seotud muudatusi.

48. Uurida tuleks kõiki silmaga täheldatavaid kahjustusi.

49. Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks teha selliste kudede ja organite histopatoloogiline uuring, milles katserühma loomadel tehti kindlaks mõju.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

50. Tulemused esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles iga katserühma kohta märgitakse loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arv, iga surma või surmamise aeg, mürgistusnähtudega loomade arv, täheldatud mürgistusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgistusnähtude ilmnemise aeg, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik, raskusaste ja iga liiki kahjustuse kohta nende loomade protsent, kellel neid esines.

51. Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Mõju võrdlemisel manustatud doosidega tuleks vältida mitme t-testi kasutamist. Statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

52. Kvaliteedikontrolliks soovitatakse koguda varasemaid kontrollkatsete andmeid ja arvutada arvandmete hajuvuskoefitsiendid, eriti näitajate puhul, mis on seotud sisesekretsioonisüsteemi häirivate kemikaalide kindlakstegemisega. Neid andmeid võib kasutada võrdlemiseks, kui hinnatakse parajasti tehtavaid uuringuid.

Katseprotokoll

53. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline olemus, puhtus ja füüsikalis-keemilised omadused;

— tunnusandmed.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valimise põhjendus, kui kandeaine on muu kui vesi.

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

— iga looma kehamass katse alguses;

— kui kasutatakse muud katselooma kui rott, siis liigi valimise põhjendus.

Katsetingimused:

— doositaseme valimise põhjendus;

— üksikasjad uuritava kemikaali koostise / söödavalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

▼**M4**

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— vajaduse korral söödas/joogivees oleva uuritava kemikaali määra (ppm) teisendus tegelikuks päevadoosiks (mg kehamassi kg kohta);

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Uuritud valikulised näitajad:

— uuritud valikuliste näitajate loetelu.

Tulemused:

— kehamass/kehamassi muutused;

— sööda tarbimine ja vajaduse korral vee tarbimine;

— toksilise mõju andmed vastavalt looma soole ja doositasemele, sealhulgas mürgistusnähud;

— kliiniliste ilmingute laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas nähud on pöörduvad või mitte);

— sensoorse aktiivsuse, haardetugevuse ja motoorse tegevuse hindamine;

— hematoloogilised näitajad ja vastavad normaalväärtused;

— kliinilise biokeemia näitajad ja vastavad normaalväärtused;

— kehamass surmamise ajal ja organite mass;

— lahkamise tulemused;

— kõikide histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— võimaluse korral andmed imendumise kohta;

— vajaduse korral tulemuste statistiline töötlus.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

▼M4

1. liide

MÕISTED

Androgeensus – kemikaali võime mõjutada imetaja organismi samamoodi kui looduslik meessuguhormoon (st testosteroon).

Antiandrogeensus – kemikaali võime alla suruda loodusliku meessuguhormooni (st testosterooni) mõju imetaja organismile.

Antiöstrogeensus – kemikaali võime alla suruda loodusliku östrogeense hormooni (st östradiool 17ß) mõju imetaja organismile.

Antitüroidne aktiivsus – kemikaali võime alla suruda loodusliku kilpnäärmehormooni (st hormoon T_3) mõju imetaja organismile.

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, doseerimise sagedust ja kestust.

Doos – manustatav uuritava kemikaali kogus. Doos väljendatakse uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks mg / kehamassi kg / päev) või söödas oleva püsiva kontsentratsioonina.

Ilmne toksilisus – üldmõiste, mis osutab selgetele mürgistusnähtudele pärast uuritava kemikaali manustamist. Kõnealused nähud peaksid olema piisavad ohu hindamiseks ja peaksid olema sellised, et manustatava doosi suurendamise tõenäoliseks tulemuseks on tugev toksilisus ning tõenäoliselt ka surm.

NOAEL – lühend, millega tähistatakse doositaset, mis ei põhjusta ilmseid mürgistusnähte. See on kõrgeim doositase, kus doseerimine ei põhjusta manustamisega seotud leide.

Östrogeensus – kemikaali võime mõjutada imetaja organismi samamoodi kui looduslik östrogeenne hormoon (st östradiool 17ß).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Türoidne aktiivsus – kemikaali võime mõjutada imetaja organismi samamoodi kui looduslik kilpnäärmehormoon (st hormoon T_3).

Valideerimine – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

▼M4

2. liide

Käesolevas katsemeetodis B.7 sisesekretsioonisüsteemi häirivate kemikaalide kindlakstegemiseks soovitatavad näitajad

Kohustuslikud näitajad	Vabalt valitavad näitajad
Mass	
— munandid	— munasarjad
— munandimanused	— emakas koos emakakaelaga
— neerupealised	— kilpnääre
— eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega	
Histopatoloogia	
— sugunäärmed:	— tupeäiged
— munandid ja	— isaslooma rinnanäärmed
— munasarjad	— ajuripats
— suguelundid:	
— munandimanused	
— eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega	
— emakas koos emakakaelaga	
— neerupealised	
— kilpnääre	
— tupp	
Hormoonide määramine	
	— T3 ja T4 tase vereringes
	— TSH tase vereringes

KIRJANDUS

1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691–704.

5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

▼M4

7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11 March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9) OECD (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343, fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14) 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.

15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404–407.

16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52–85.

17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524–533.

18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. **SUBAKUUTNE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 28-PÄEVANE UURING**

KOKKUVÕTE

Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.8 on koostatud uuritava kemikaali sissehingamisega toimuval korduval kokkupuutel piiratud ajavahemiku jooksul (28 päeva) avalduva mürgisuse täielikuks iseloomustamiseks ning sissehingamise riski kvantitatiivse hindamise andmete saamiseks. Vähemalt viiest isas- ja viiest emasloomast koosnevad närilisterühmad viiakse 28 päeva jooksul kuus tundi päevas kokkupuutesse a) uuritava kemikaaliga kolmel või enamal kontsentratsioonil, b) filtritud õhuga (negatiivne kontrollgrupp) ja/või c) kandeainega (kandeaine kontrollrühm). Loomade kokkupuude toimub üldjuhul viiel päeval nädalas, aga lubatud on ka kokkupuude seitsmel päeval nädalas. Alati katsetatakse nii isas- kui ka emasloomi, aga neid võidakse viia kokkupuutesse erinevate kontsentratsioonidega, kui on teada, et üks sugu on konkreetse uuritava kemikaali suhtes tundlikum. See meetod võimaldab uuringu juhile paindlikkust kaasata satelliitrühmad (pöörduvuse rühmad), teha bronhoalveolaarset lavaaži (BAL), neuroloogiakatseid ning täiendavaid kliinilise patoloogia ja histopatoloogia alaseid hindamisi, et uuritava kemikaali mürgisust paremini iseloomustada.

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 412 (2009). Algne sissehingamisel avalduvat subakuutset mürgisust käsitlev katsejuhend (katsejuhend nr 412) võeti vastu 1981. aastal (1). Käesolev katsemeetod B.8 (mis on samaväärne katsejuhendi nr 412 läbivaadatud versiooniga) on ajakohastatud, et võtta arvesse teaduse taset ja rahuldada praegusi ja tulevasi regulatiivseid vajadusi.

2. Käesolev meetod võimaldab iseloomustada uuritava kemikaali sissehingamisega toimuval korduval igapäevasel kokkupuutel 28 päeva jooksul avaldatavat kahjulikku mõju. Sissehingamisel avalduva subakuutse mürgisuse 28-päevastest uuringutest saadud andmeid on võimalik kasutada kvantitatiivseteks riskihindamisteks (kui neile ei järgne sissehingamisel avalduva subkroonilise mürgisuse 90-päevane uuring (käesoleva lisa peatükk B.29)). Andmetest saab samuti teavet pikema ajavahemiku uuringu jaoks (näiteks sissehingamise subkroonilise mürgisuse 90-päevase uuringu jaoks) kontsentratsioonide valimiseks. Käesolev katsemeetod ei ole spetsiaalselt ette nähtud nanomaterjalide katsetamiseks. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 39 (2).

LÄHTEKAALUTLUSED

3. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et parandada uuringu kvaliteeti ja minimeerida loomade kasutamist. Teave, mis aitab valida katseks sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalis-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta ning sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katsete andmed. Kui uuringu puhul eeldatakse neurotoksilisust või täheldatakse uuringus selle olemasolu, võib uuringu juht otsustada teha sellekohased hindamised, näiteks funktsionaalsed vaatluskatsed (*functional observational battery*, FOB) ja motoorse aktiivsuse mõõtmise. Kuigi konkreetsete hindamiste jaoks kokkupuute korraldamise ajastus võib olla kriitilise tähtsusega, ei tohiks kõnealused täiendavad uuringud põhiuuringu kava elluviimist segada.

▼M4

4. Söövitava või ärritava uuritava kemikaali lahjendatud lahuseid võib katsetada kontsentratsioonil, mis annab soovitud mürgisuse määra (vt juhenddokument nr 39 (2)). Loomade kokkupuutesse viimisel kõnealuste materjalidega peaks sihtkontsentratsioon olema piisavalt väike, et see ei põhjustaks märkimisväärset valu ega kannatusi, kuid piisav, et pikendada kontsentratsiooni-mõju kõver tasemeni, millega saavutatakse katse regulatiivne ja teaduslik eesmärk. Kõnealused kontsentratsioonid tuleks valida juhtumipõhiselt, eelistatavalt asjakohaselt koostatud doosipiirkonna määramise katse alusel, millega saadakse teavet kõige olulisema näitaja, ärrituse ilmnemise lävieväärtuse ja aja kohta (vt punktid 11–13). Tuleks esitada kontsentratsiooni valimise põhjendus.

5. Suremas olevad loomad ja loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata. Suremas olevaid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhised prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas OECD juhenddokumendis (3).

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

6. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Eelistatud liigiks on rott. Muu liigi kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

Loomade ettevalmistamine

7. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Randomiseerimise päeval peaksid loomad olema seitsme kuni üheksa nädala vanused noored täiskasvanud. Kehamass ei tohiks erineda rohkem kui ± 20 % samast soost loomade keskmisest kehamassist. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks ning hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda.

Pidamistingimused

8. Loomad peaksid olema individuaalselt märgistatud, võimaluse korral nahaaluse transponderiga, et hõlbustada vaatlusi ja vältida segiajamist. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandeainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuude toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele ülearuseid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise minutimahtu. Kui on kättesaadavad üldandmed, mille kohaselt kõnealuseid muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, ei ole eelnev hoiutoruga kohanemine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokku puutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisöötasid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatus koguses kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

▼M4

Inhalatsioonikambrid

9. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärki. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu erieesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuude kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht kambris ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhenddokumendis nr 39 (2).

TOKSILISUSE UURINGUD

Piirkontsentratsioonid

10. Erinevalt ägeda mürgisuse uuringutest ei ole sissehingamisel avalduva subakuutse mürgisuse 28-päevastel uuringutel kindlaksmääratud piirkontsentratsioone. Maksimaalse katsetatava kontsentratsiooni valimisel tuleks arvesse võtta järgmist: 1) maksimaalne saavutatav kontsentratsioon, 2) millise kemikaalikontsentratsiooniga võib inimene kokku puutuda halvimal juhul, 3) vajadus säilitada piisav varustatus hapnikuga ja/või 4) loomade heaolu kaalutlused. Kui andmetel põhinevad piirangud puuduvad, võib kasutada määruse (EÜ) nr 1272/2008 (13) ägeda mürgisuse piirmäärasid (st kuni kontsentratsioonini 5 mg/l aerosooli puhul, 20 mg/l auru puhul ja 20 000 ppm gaasi puhul); vt juhenddokument nr 39 (2). Kui kõnealune piirmäär tuleb gaasi või väga lenduva uuritava kemikaali (näiteks külmutusagens) katsetamisel ületada, tuleks seda põhjendada. Piirkontsentratsioonil peaks ilmnema üheselt mõistetav mürgisus, kuid see ei tohiks põhjustada loomadele liigset stressi ega lühendada nende elu (3).

Doosipiirkonna määramise katse

11. Enne põhiuuringu alustamist võib olla vaja teha doosipiirkonna määramise katse. Doosipiirkonna määramise katse on eeluuringust põhjalikum, kuna selles ei piirduta kontsentratsiooni valimisega. Doosipiirkonna määramise katsest saadud teadmistest võib sõltuda põhiuuringu edukus. Doosipiirkonna määramise katses võidakse näiteks saada tehnilist teavet analüüsimeetodite ja osakeste suuruse määramise kohta, teha kindlaks toksilisusmehhanisme, saada kliinilise patoloogia ja histopatoloogia andmeid ning hinnata, milline võib põhiuuringus olla täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) ja minimaalne mürgine kontsentratsioon (MTC). Uuringu juht võib otsustada kasutada doosipiirkonna määramise katset, et määrata kindlaks hingamisteede ärrituse läviväärtus (näiteks hingamisteede histopatoloogia, kopsutalitluse katsete või bronhoalveolaarse lavaaži abil), maksimaalne kontsentratsioon, mille juures loomadele ei tekitata liigset stressi, ja uuritava kemikaali mürgisust kõige paremini iseloomustavad parameetrid.

12. Doosipiirkonna määramise katse võib hõlmata ühte või enamat kontsentratsiooni. Iga kontsentratsiooniga peaks kokku puutuma kuni kolm isas- ja kolm emaslooma. Doosipiirkonna määramise katse peaks kestma vähemalt viis päeva ja üldjuhul mitte kauem kui 14 päeva. Põhiuuringu kontsentratsioonide valimise põhjendused tuleks esitada uuringuprotokollis. Põhiuuringu eesmärk on näidata mõju sõltuvust kontsentratsioonist eelduste kohaselt kõige tundlikuma näitaja alusel. Väike kontsentratsioon peaks ideaaljuhul olema täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon ja suur kontsentratsioon peaks näitama üheselt mõistetavat mürgistust, kuid see ei tohiks põhjustada loomadele liigset stressi ega lühendada nende elu (3).

▼M4

13. Doosipiirkonna määramise katse jaoks kontsentratsioonide valimisel tuleks arvesse võtta kogu saadaolevat teavet, sh struktuuri-aktiivsuse sõltuvusi ja samalaadseid kemikaale käsitlevaid andmeid (vt punkt 3). Doosipiirkonna määramise katse võib kinnitada mehhanistlike kriteeriumide alusel kõige tundlikumaks peetavaid näitajaid, nagu organofosfaatide põhjustatud koliinesteraasi inhibeerimine, erütrotsütotoksiliste ainete põhjustatud methemoglobiini teke, türoidhormoonid (T_3, T_4) türotoksikantide puhul, valk, laktaatdehüdrogenaas (LDH) või neutrofiilid bronhoalveolaarses lavaažis ohutute vähe lahustuvate osakeste või kopse ärritavate aerosoolide puhul, või need ümber lükata.

Põhiuuring

14. Subakuutse mürgisuse põhiuuring hõlmab üldjuhul kolme kontsentratsiooni ning vajaduse korral samuti samaaegseid negatiivseid (õhu) ja/või kandeaine kontrollrühmi (vt punkt 17). Asjakohaste kokkupuutetasemete valimisel tuleks kasutada kõiki kättesaadavaid andmeid, sh süsteemse mürgisuse uuringute, metaboliseerimise ja kineetika uuringute tulemusi (eriti tuleks tähelepanu pöörata suure kontsentratsiooni vältimisele, mille puhul kineetilised protsessid küllastatakse). Iga katserühm koosneb vähemalt kümnest närilisest (viis isas- ja viis emaslooma), kes viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse kuueks tunniks päevas viiel päeval nädalas nelja nädala vältel (uuringu kogukestus on 28 päeva). Loomad võib viia kokkupuutesse ka seitsmel päeval nädalas (näiteks sissehingatavate ravimite katsetamisel). Kui üks sugu on teatava uuritava kemikaali suhtes teadaolevalt tundlikum, võib eri sugude puhul kasutada kokkupuutel erinevaid kontsentratsioone, et optimeerida mõju kontsentratsioonist sõltuvust, nagu on kirjeldatud punktis 15. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu närilisele liigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Päevas vähem kui kuuetunnise kokkupuute kasutamisel või kui on vajalik korraldada pika kestusega (näiteks 22 tundi päevas) kogu keha kaudu kokkupuute uuring, tuleb seda põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Loomi ei tohiks kokkupuute ajal sööta, v.a juhul, kui kokkupuuteperiood ületab kuut tundi. Kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal võib loomadele anda vett.

15. Valitud sihtkontsentratsioonid peaksid võimaldama kindlaks teha sihtorgani(d) ja saada mõju selge sõltuvus kontsentratsioonist.

— Suur kontsentratsioon peaks põhjustama mürgist mõju, kuid ei tohiks põhjustada püsivaid nähte ega surma, mis takistaks usaldusväärset hindamist.

— Keskmine (keskmised) kontsentratsioon(id) peaks(id) olema eraldatud, et esile kutsuda eri tugevusega mürgist mõju väikese ja suure kontsentratsiooni vahemikus.

— Väike kontsentratsioon peaks põhjustama vähe mürgistusnähtusid või olema mõjuta.

Satelliituuring (pöörduvuse uuring)

16. Mürgistuse pöörduvuse, püsivuse või viivitusega avaldumise jälgimiseks võidakse korraldada satelliituuring (pöörduvuse uuring) töötlusjärgsel asjakohase pikkusega ajavahemikul, mis ei tohi olla lühem kui 14 päeva. Satelliitrühmades (pöörduvuse rühmades) on viis isas- ja viis emaslooma, kellele korraldatakse kokkupuude põhiuuringu katseloomadega samal ajal. Satelliituuringu (pöörduvuse uuringu) rühmad peaksid uuritava kemikaaliga kokku puutuma suurimal kontsentratsioonil ning vajaduse korral tuleks kasutada samaaegseid õhu ja/või kandeaine kontrollrühmi (vt punkt 17).

▼M4

Loomade kontrollrühm

17. Samaaegse negatiivse (õhu) kontrollrühma loomi tuleks kohelda katserühma loomadega samalaadsel viisil selle erinevusega, et nad viiakse uuritava kemikaali asemel kokkupuutesse filtritud õhuga. Kui katsekeskkonna loomisel kasutatakse vett või muud ainet, tuleks uuringus kasutada negatiivse (õhu) kontrollrühma asemel kandeaine kontrollrühma. Võimaluse korral tuleks kandeainena alati kasutada vett. Kui kandeainena kasutatakse vett, peaks loomade kontrollrühm puutuma kokku sama suhtelise õhuniiskusega õhuga kui katse käigus kokku puutuvad rühmad. Sobiva kandeaine valimine peaks põhinema asjakohasel eeluuringul või varasematel andmetel. Kui kandeaine mürgisus ei ole hästi teada, võib uuringu juht otsustada kasutada nii negatiivset (õhu) kontrollrühma kui ka kandeaine kontrollrühma, kuid see ei ole soovitatav. Kui varasematest andmetest nähtub, et kandeaine ei ole mürgine, ei ole negatiivset (õhu) kontrollrühma vaja ja tuleks kasutada ainult kandeaine kontrollrühma. Kui kandeaines oleva uuritava kemikaali eeluuringust mürgisust ei nähtu, siis võib järeldada, et kandeaine ei ole katsetataval kontsentratsioonil mürgine ja tuleks kasutada selle kandeaine kontrollrühma.

KOKKUPUUTETINGIMUSED

Kontsentratsioonide manustamine

18. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsikalisest vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügroskoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist. Aineosakesi võib osakeste suuruse vähendamiseks mehaaniliselt töödelda. Täpsemad juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

Osakeste suurusjaotus

19. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosoole, mille osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–3 μm ning geomeetriline standardhälve (σ_g) on 1,5–3,0 (4). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdihinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed võivad olla kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed ja kiud võivad sätestatud näitajaid ületada.

Uuritava kemikaali preparaat kandeaines

20. Ideaaljuhul tuleks uuritavat kemikaali katsetada ilma kandeaineta. Kui kandeaine kasutamine on vajalik sobiva uuritava kemikaali kontsentratsiooni ja osakeste suuruse tekitamiseks, tuleks eelistatavalt kasutada vett. Alati, kui uuritav kemikaal lahustatakse kandeaines, tuleks tõendada uuritava kemikaali stabiilsust.

KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE

Kambri õhuvarustus

21. Kokkupuutekambri õhuvarustust tuleks hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed iga kokkupuute korral vähemalt kord tunnis registreerida. Katsekeskkonna kontsentratsiooni (või ajalise stabiilsuse) reaalajas seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit sissehingamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Kui kontsentratsiooni jälgitakse reaalajas, võib

▼M4

õhuvoogude mõõtmise sageduse vähendada ühele mõõtmisele kokkupuute kohta päevas. Ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldava kambri puhul tuleks eritähelepanu pöörata väljahingatud õhu uuesti sissehingamise vältimisele. Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid norme ei ole võimalik täita, tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisisaldust mõõta. Kui kokkupuute esimese päeva mõõtmistest nähtub, et kõnealuste gaaside sisaldus on nõuetekohasel tasemel, ei peaks edasine mõõtmine olema vajalik.

Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus

22. Kambri temperatuur tuleks hoida 22 ± 3 °C juures. Loomade hingamistsooni suhtelist õhuniiskust nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu toimuva kokkupuute korral tuleks pidevalt seirata ja see tuleks registreerida võimaluse korral üks kord tunnis iga kokkupuute ajal. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatavalt hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu ei pruugi see olla saavutatav (näiteks veepõhise segu uurimisel) või mõõdetav.

Uuritav kemikaal: nimikontsentratsioon

23. Kui see on võimalik, tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambrisüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katsesüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

Uuritav kemikaal: tegelik kontsentratsioon

24. Tegelik kontsentratsioon on inhalatsioonikambris loomade hingamistsoonist võetud proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik saada kas spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetriline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vähelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud konkreetse kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilist analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutuda vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelistatult lenduvas olekus) kordusanalüüse korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase.

25. Võimaluse korral tuleks kogu katse jooksul kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsidest või muud hinnangud. Kuigi uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määratlemise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).

▼M4

26. Kokkupuutekeskkonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna. Kokkupuutetingimuste stabiilsuse tõendamiseks võib kasutada reaalajas seire seadet, näiteks aerosooli fotomeetrit aerosoolide puhul või süsivesinike kogusisalduse analüsaatorit aurude puhul. Tegelikku kambrikontsentratsiooni tuleks mõõta vähemalt kolm korda iga kokkupuutepäeva jooksul iga kokkupuutekontsentratsiooni kohta. Kui see piiratud õhuvarustuse või väikeste kontsentratsioonide tõttu ei ole võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Ideaaljuhul tuleks kõnealune proov võtta kogu kokkupuuteaja jooksul. Kambrist võetud proovide kontsentratsioon ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui ±10 % gaaside ja aurude puhul või ±20 % vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg (t_{95}) ja see registreerida. Kokkupuute ajavahemik kestab selle aja, kui uuritavat kemikaali lisatakse. Selles võetakse arvesse aega, mis on vajalik kambri tasakaaluseisundi saavutamiseks (t_{95}) ja kontsentratsiooni vähenemiseks. Juhendid t_{95} hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

27. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskkonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoode või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambris erinevalt. Seepärast tuleks valida vähemalt üks uuritav aine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, tuleks kirja panna kogu segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

Uuritav kemikaal: osakeste suurusjaotus

28. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt iga nädal iga kontsentratsiooni kohta, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet.

29. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada muud seadet, näiteks gravimeetrilist filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kui uuringu varajases etapis on kõikidel uuritavatel kontsentratsioonidel võimalik tõendada võrdväärsust, võib täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest loobuda. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katsest ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik uuringut korrata.

30. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool või kui auru keskkonnas tuvastatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga.

VAATLUSED

31. Loomi tuleks enne kokkupuuteperioodi, selle vältel ja pärast seda kliiniliselt jälgida. Olenevalt loomade reageerimisest kokkupuutele võidakse ette näha sagedasem jälgimine. Kui loomade jälgimist takistab looma hoiutoru, halvasti valgustatud kogukehakamber või läbipaistmatu keskkond, tuleks loomi hoolikalt jälgida pärast kokkupuudet. Enne järgmise päeva kokkupuudet toimuva jälgimise abil on võimalik hinnata mürgise mõju pöörduvust või süvenemist.

▼M4

32. Kõik vaatlusandmed registreeritakse iga looma kohta eraldi. Kui loomad surmatakse humaansetel kaalutlustel või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

33. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade, limaskestade, hingamis-, vereringe- ja närvisüsteemi muutusi, samuti somatomotoorse aktiivsuse ja käitumismustri muutusi. Tähelepanu peaks olema suunatud värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma kindlakstegemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega. Uuringusse võib lisada täiendavaid hindamisi, nagu kineetika, bioseire, kopsutalitlus, kopsukudedesse kogunevate vähe lahustuvate materjalide püsivus ja käitumismuutused.

KEHAMASS

34. Iga looma kehamass tuleks registreerida natuke enne esimest kokkupuudet (päev 0) ja seejärel kaks korda nädalas (näiteks reedeti ja esmaspäeviti, et tõendada taastumist ilma kokkupuuteta nädalavahetuse jooksul, või pärast ajavahemikku, mis võimaldab süsteemse mürgisuse hindamist) ning surma või eutanaasia ajal. Kui esimese kahe nädala jooksul nähtusid ei ilmne, võib ülejäänud uuringu vältel mõõta kehamassi kord nädalas. Satelliitrühma (pöörduvuse rühma) loomade (kui neid kasutatakse) kaalumist tuleks jätkata iga nädal kogu taastumisperioodi vältel. Uuringu lõpetamisel tuleks iga looma veidi enne surmamist kaaluda, et võimaldada organite ja kehamassi suhte täpset arvutamist.

SÖÖDA JA VEE TARBIMINE

35. Sööda tarbimist tuleks mõõta iga nädal. Samuti võib mõõta vee tarbimist.

KLIINILINE PATOLOOGIA

36. Kliinilise patoloogia hindamised tuleks teha igale loomale, sh kontrollrühma ja satelliitrühma (pöörduvuse rühma) loomadele, kui nad surmatakse. Kokkupuute lõpetamise ja vereproovide võtmise vaheline ajavahemik tuleks registreerida, eriti kui kõnealuse näitaja taastumine on kiire. Plasmast kiiresti kaduvate indikaatorainete (näiteks COHb, CHE ja MetHb) määramiseks tuleb proov võtta kohe pärast kokkupuute lõppu.

37. Tabelis 1 on loetletud kliinilised patoloogilised parameetrid, mida nõutakse üldjuhul kõigi toksikoloogiliste uuringute puhul. Uriinianalüüs ei ole alati vajalik; selle võib teha, kui seda oodatava või ilmnenud toksilisuse tõttu peetakse kasulikuks. Uuringu juht võib uuritava kemikaali mürgisuse paremaks iseloomustamiseks otsustada hinnata täiendavaid parameetreid (näiteks koliinesteraas, lipiidid, hormoonid, happe-aluse tasakaal, methemoglobiin või Heinzi kehakesed, kreatiinkinaas, müeloidi/erütroidi suhe, troponiinid, arteriaalse vere gaasid, laktaatdehüdrogenaas, sorbitooldehüdrogenaas, glutamaatdehüdrogenaas ja γ-glutamüül-transpeptidaas).

▼M4

Tabel 1

Standardsed kliinilise patoloogia parameetrid

Hematoloogia	
Erütrotsüütide arv	Leukotsüütide koguarv
Hematokrit	Diferentseeritud leukotsüütide arv
Hemoglobiini kontsentratsioon	Trombotsüütide arv
Hemoglobiini keskmine kogus erütrotsüüdis (MCH)	Hüübimisvõime (valige üks):
Keskmine erütrotsüüdi maht (MCV)	— protrombiini aeg
Hemoglobiini keskmine kontsentratsioon erütrotsüüdis	— hüübimisaeg
Retikulotsüüdid	— osalise tromboplastiini aeg

Kliiniline keemia	
Glükoos (*)	Alaniinaminotransferaas
Üldkolesterool	Aspartaataminotransferas
Triglütseriidid	Leeliseline fosfataas
Vere karbamiidlämmastik	Kaalium
Üldbilirubiin	Naatrium
Kreatiniin	Kaltsium
Üldvalk	Fosfor
Albumiin	Kloriid
Globuliin	

Uriinianalüüs (valikuline)	
Välimus (värvus ja hägusus)	Üldvalk
Kogus	Glükoos
Suhteline tihedus või osmolaalsus	Veri/vererakud
pH	

(*) Kuna pikaajaline nälgimine võib põhjustada glükoosi mõõtmise tulemuste erinevust katserühma ja kontrollrühma loomade vahel, peaks uuringu juht otsustama, kas loomade söödata jätmine on asjakohane. Kui loomad jäetakse söödata, peaks ajavahemik olema vastav kasutatavale liigile; roti puhul võib see ajavahemik olla 16 tundi (nälgimine öö jooksul). Paastuglükoosi võib määrata pärast öist nälgimist viimasel kokkupuutenädalal või pärast öist nälgimist enne lahkamist (viimasel juhul määratakse paastuglükoos koos kõigi muude kliinilise patoloogia näitajatega).

38. Kui on tõendeid, et peamine kogunemise ja säilitamise piirkond on madalamad hingamisteed (s.o alveoolid), võib oletatava doosi-toime seose parameetrite kvantitatiivseks hindamiseks kasutada bronho-alveolaarset lavaaži, keskendudes alveoliidile, kopsukoe põletikule ja fosfolipidoosile. See võimaldab asjakohaselt kontrollida alveolaarse kahjustuse puhul esinevat doosi-toime seost ning toime sõltuvust ajast. Bronhoalveolaarse lavaaži vedelikku võib analüüsida leukotsüütide üldarvu ja diferentseeritud leukotsüüdiarvude, üldvalgu ja laktaatdehüdrogenaasi määramiseks. Veel võib kaaluda lüsosoomide kahjustust, fosfolipidoosi, fibroosi ning ärritus- või allergilist põletikku tõendavate näitajate määramist, selleks võib määrata ka põletikuaineid tsütokiine/kemokiine. Bronhoalveolaarse lavaaži mõõtmised üldiselt täiendavad histopatoloogiliste uuringute tulemusi, kuid ei saa neid asendada. Kopsude lavaaži tegemise juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

▼M4

MAKROPATOLOOGIA JA ORGANITE MASS

39. Kõik katseloomad (kaasa arvatud katse käigus surnud, humaansel viisil surmatud või uuringust looma heaolu tagamiseks kõrvaldatud loomad) tuleks (võimaluse korral) täielikult veretustada ja täielikult lahata. Iga looma viimase kokkupuute lõpu ja surmamise vaheline ajavahemik tuleks registreerida. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritähelepanu hingamisteede mis tahes muutustele.

40. Tabelis 2 on loetletud organid ja koed, mis täieliku lahkamise ajal tuleks sobivas keskkonnas säilitada histopatoloogilise uuringu jaoks. [Nurksulgudes esitatud] organite ja kudede ning muude organite ja kudede säilitamise otsustab uuringu juht. **Paksus kirjas esitatud** organid tuleb välja puhastada ja kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Kilpnääret ja munandimanuseid tuleks kaaluda ainult vajaduse korral, kuna nende väljapuhastamisel tekkivad moonutused võivad takistada histopatoloogilist hindamist. Koed ja organid tuleks paigutada 10 % puhverdatud formaliini või muusse sobivasse fikseerivasse ainesse vahetult pärast lahkamist ja mitte vähem kui 24–48 tundi enne väljapuhastamist, olenevalt kasutatavast fikseerivast ainest.

Tabel 2

Täieliku lahkamise juures säilitatavad organid ja koed

Neerupealised	Seemnepõiekesed
Luuüdi (ja/või värske aspiraat)	Seljaaju (kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/ajusild)	**Põrn**
[Silmad (võrkkest, nägemisnärv) ja silmalaud]	Magu
Süda	**Munandid**
Neerud	**Harknääre**
Kõri (3 taset, üks tase hõlmab kõripealise põhja)	Kilpnääre
Maks	Hingetoru (vähemalt 2 tasandit, sh 1 pikisuunaline lõige läbi hingetoruharja ja 1 ristlõige)
Kopsud (kõik ühe tasandi sagarad, sh peamised bronhid)	[Kusepõis]
Lümfisõlmed kopsu kopsuvärati piirkonnast eelkõige vähe lahustuvatest osakestest koosneva uuritava kemikaali korral. Põhjalikuma immunoloogiavaatluse või -uuringu jaoks võib kaaluda täiendavate lümfisõlmede, näiteks keskseinandi, kaela/submandibulaarse ja/või kõrva piirkonna lümfisõlmede säilitamist.	Emakas
Nasofarüngeaalsed koed (vähemalt neljal tasandil; üks tasand peab hõlmama nasofarüngeaalset kanalit ja ninaga seotud lümfikude (NALT)).	Kõik silmaga nähtavad kahjustused
Söögitoru	
[Haistmissibul]	
Munasarjad	

▼M4

41. Kopsud tuleks tervena eemaldada, kaaluda ja paigutada sobivasse fikseerivasse ainesse rõhul 20–30 cm veesammast, et tagada kopsude struktuuri säilimine (5). Tuleks koguda ühel tasandil tehtud lõiked kõikidest sagaratest, sh peamistest bronhidest, kuid kui tehakse kopsude lavaaž, tuleks sellest sagarast, millele lavaaži ei tehtud, teha lõiked kolmel tasandil (mitte seeriaviisilised lõiked).

42. Tuleks uurida vähemalt nelja nasofarüngeaalsete kudede tasandit, millest üks peaks hõlmama nasofarüngeaalset kanalit (5, 6, 7, 8, 9), et võimaldada asjakohaselt uurida skvamoosrakulist, üleminekuhingamisteede (*clara*-rakud), hingamisteede (ripsepiteel) ja olfaktoorset epiteeli ning neid dreenivat lümfikude (NALT; 10, 11). Tuleks uurida kõri kolme tasandit ja üks neist tasanditest peaks hõlmama kõripealise põhja (12). Tuleks uurida vähemalt kahte hingetoru tasandit, sh ühte pikisuunalist lõiget läbi peabronhide bifurkatsiooni harja ja ühte ristlõiget.

HISTOPATOLOOGIA

43. Kontrollrühma ja suure kontsentratsiooni rühma ning kõigi loomade puhul, kes uuringu jooksul surevad või surmatakse, tuleks teha kõigi tabelis 2 loetletud organite ja kudede histopatoloogiline hindamine. Eritähelepanu tuleks pöörata hingamisteedele, sihtorganitele ja nähtavatele kahjustustele. Organeid ja kudesid, milles suure kontsentratsiooni rühma isenditel leiti kahjustusi, tuleks uurida kõigi rühmade isenditel. Uuringu juht võib otsustada teha histopatoloogilised hindamised täiendavate rühmade puhul, et tõendada selget sõltuvust kontsentratsioonist. Kui kasutatakse satelliitrühma (pöörduvuse rühma), tuleks teha kõigi selliste kudede ja organite histopatoloogiline hindamine, milles katserühmade indiviididel leiti muutusi. Kui suure kokkupuute rühmas sureb liiga palju loomi varajases etapis või tekib muid probleeme, mis muudavad andmete tähenduse ähmaseks, tuleks histopatoloogiliselt uurida järgmise väiksema kontsentratsiooni rühma. Tuleks püüda omavahel seostada üldisi tähelepanekuid ja mikroskoopilisi leide.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

44. Iga looma kohta tuleks esitada kehamassi, sööda tarbimise, kliinilise patoloogia, üldpatoloogia, organite massi ja histopatoloogia andmed. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguleiud. Kõiki tulemusi, nii kvantitatiivseid andmeid kui ka üksiktähelepanekuid, tuleks sobiva statistilise meetodi abil hinnata. Võib kasutada kõiki üldtunnustatud statistilisi meetodeid; statistilised meetodid tuleks valida juba uuringu kavandamisel.

Katseprotokoll

45. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseloomad ja pidamistingimused

— Puuritingimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline õhuniiskus, valgustusperiood ja sööt.

▼M4

— Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus. Võib esitada lähteandmed ja varasemad andmed, kui need on saadud loomade kohta, kes viidi kemikaaliga kokkupuutesse samasugustes kokkupuute-, pidamis- ja nälgimistingimustes.

— Loomade arv, vanus ja sugu.

— Randomiseerimismeetod.

— Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

Uuritav kemikaal

— Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).

— Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

Kandeaine

— Kandeaine kasutamise põhjendus ja kandeaine valiku põhjendus (kui kandeainena ei kasutata vett).

— Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

Inhalatsioonikamber

— Inhalatsioonikambri üksikasjalik kirjeldus, sh selle mahu andmed ja joonis.

— Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.

— Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.

— Õhuallikas ja õhu konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.

— Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kaliibrimisel kasutatud meetodid.

— Rõhuvahe (positiivne või negatiivne).

— Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine kambris (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Katsekeskkonna (atmosfääri) stabiilsus.

— Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonnast proovide võtmine kambris.

— Sissejuhitud ja väljatõmmatud õhu töötlemine.

— Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuutepordi kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg (t_{95}).

— Kogu kambris oleva õhu vahetuste arv tunnis.

— Mõõteseadmed (vajaduse korral).

Andmed kokkupuute kohta

— Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.

▼**M4**

— Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambrisse suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).

— Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsoonist kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse iga faasi eraldi analüüsida.

— Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikutena (mg/l, mg/m^3 jne), mitte mahuühikutena (ppm, ppb jne).

— Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetriline standardhälve (σ_g) ning nende arvutamise meetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

Katsetingimused

— Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks.

— Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).

— Kambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoo jälgimiseks kasutatud seadmete üksikasjad (st kalibreerimiskõvera koostamine).

— Kambrikontsentratsiooni ja osakeste suurusjaotuse määramise proovide kogumise seadmete andmed.

— Kasutatud keemilise analüüsi meetodi ja selle valideerimise üksikasjad (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsimisel).

— Loomade katse- ja kontrollrühma määramiseks kasutatud randomiseerimismeetod.

— Üksikandmed sööda ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas).

— Katsekontsentratsioonide valiku põhjendus.

Tulemused

— Tabelid katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.

— Tabelid kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni andmete kohta.

— Tabelid osakeste suurusjaotuse kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja σ_g arvutamine.

— Tabelid iga looma reageerimise ja kontsentratsioonide kohta (st mürgistusnähtudega loomad, kaasa arvatud surnud loomad, mõjude laad, raskus, ilmumise aeg ja kestus).

▼M4

— Tabelid iga katselooma kehamassi kohta.

— Tabelid sööda tarbimise kohta.

— Tabelid kliinilise patoloogia andmete kohta.

— Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

— Tabelid kõigi muude mõõdetud näitajate kohta.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine

— Eritähelepanu tuleks pöörata selliste meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.

— Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda küsimust, kas osakeste suurus oli sobiv sissehingamiseks, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.

— Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõlalisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.

— Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).

— Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (3) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaansel viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.

— Tuleks kindlaks teha sihtorgan(id).

— Tuleks määrata kindlaks täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) ja väikseim täheldatavat kahjulikku toimet avaldav kontsentratsioon (LOAEL).

KIRJANDUS

1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229–258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼**M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼B

B.9. **KORDUSDOOSI MÜRGISUS (28 PÄEVA, NAHAKAUDNE)**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Testainet kantakse 28 päeva jooksul iga päev astmeliste annustena mitme rühma katseloomade nahale nii, et üks rühm saab ühesuguse annuse. Manustamisperioodil jälgitakse loomi iga päev, et kontrollida mürgistusnähtude ilmnemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Ettevalmistused**

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsele vastavatel pidamis- ja söötmistingimustel. Noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse katse- ja kontrollrühmadesse. Vahetult enne katset eemaldatakse pügamise teel katselooma keha seljaosalt karvkate. Kasutada võib ka raseerimist, seda tuleks teha 24 tundi enne katset. Korduspügamist või -raseerimist on tavaliselt vaja ligikaudu nädalaste vahedega. Karvkatte pügamisel või raseerimisel tuleb vältida naha marrastamist. Testaine nahale kandmiseks tuleb vabastada vähemalt 10 % kehapinnast. Vabastatava ala ja katte mõõtmete valikul tuleks arvesse võtta looma massi. Tahkete, vajaduse korral peenestatud ainete puhul tuleks testainet nahaga hea kokkupuute saavutamiseks niisutada piisava koguse vee või sobiva kandjaga. Vedelaid testaineid kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul. Testainet kantakse nahale kord päevas, 5–7 päeval nädalas.

1.6.2. **Katsetingimused**

1.6.2.1. *Katseloomad*

Kasutada võib täiskasvanud rotti, küülikut või merisiga. Kasutada võib ka muid liike, kuid seda tuleb põhjendada.

▼B

Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses ei tohiks ületada ± 20 % vastavast keskmisest.

1.6.2.2. *Katseloomade arv ja sugu*

Iga uuritavat annusemäära katsetakse vähemalt kümnel terve nahaga loomal (viiel emas- ja viiel isasloomal). Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kui uuringu jooksul plaanitakse loomi surmata, tuleks loomade arvu enne uuringu lõppu surmamisele määratud loomade arvu võrra suurendada. Lisaks võib testaine kõrgeima annusega mõjutada 28 päeva jooksul üht kümne loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitrühma ja jälgida sellel 14 päeva jooksul pärast kokkupuudet mürgistusnähtude pöörduvust, püsivust või hilist avaldumist. Kasutatakse ka üht kümne kontroll-loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitrühma.

1.6.2.3. *Annused*

Kasutatakse vähemalt kolme annusemäära ja kontrolli või kandja kasutamisel kandja kontrolli. Kokkupuuteperioodi kestus peaks olema vähemalt kuus tundi päevas. Testainet tuleks peale kanda iga päev sarnastel kellaaegadel ja annuseid järk-järgult (üks või kaks korda nädalas) reguleerida, et annus jääks looma kehamassi suhtes konstantseks. Testainega töötlemine välja arvatud, tuleks kontrollrühma loomi kohelda samamoodi nagu katserühma loomi. Kui annustamise lihtsustamiseks kasutatakse kandjat, tuleks kandja kontrollrühmale manustada kandjat analoogselt katserühmaga ja nad peaksid saama sama koguse kandjat nagu kõrgeima annusemääraga rühm. Kõrgeim annus peaks põhjustama mürgistusnähte, kuid ei tohiks põhjustada suremust või siis peaks suremus olema väike. Väikseima doosi puhul ei tohiks mürgisust ilmneda. Kasutuskõlbliku hinnangulise inimkokkupuute annuse olemasolul peaks madalaim annus olema sellest kõrgem. Ideaaljuhul peaks keskmine annusemäär põhjustama minimaalseid täheldatavaid mürgistusnähte. Rohkem kui ühe vahepealse annuse kasutamisel peaks annusemäärad jaotuma nii, et tekkivad mürgistusnähud jaotuvad astmeliselt. Tulemuste usaldusväärse hindamise võimaldamiseks peaks suremus madala ja vahepealsete annusemääradega ning kontrollrühmades olema madal.

Kui testaine nahale kandmine toob kaasa tugeva nahaärrituse, tuleks kontsentratsioone vähendada; selle tulemuseks võib olla muude mürgistusnähtude vähenemine või puudumine kõrgeima annusemäära kasutamisel. Lisaks võib tõsiste nahakahjustuste ilmnemisel olla vaja uuring lõpetada ja teha madalamatel kontsentratsioonidel uus uuring.

1.6.2.4. *Piirsisalduskatse*

Kui eelkatse annusemääraga 1 000 mg/kg või kõrgema, võimaliku teadaoleva inimkokkupuute kontsentratsiooniga seotud annusemääraga ei kutsu esile mürgistusnähte, võib edasise kontrollimise lugeda tarbetuks.

1.6.2.5. *Vaatlusperiood*

Kõigil katseloomadel tuleb iga päev jälgida mürgistusnähtude ilmnemist. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise ning surma aeg on väga olulised ning tuleks registreerida.

▼B

1.6.3. **Katse käik**

Loomi tuleks puurides pidada ühekaupa. Testainet kantakse loomade nahale 28 päeva jooksul, ideaaljuhul 7 päeval nädalas. Mis tahes satelliitrühma loomadele, kellega planeeritakse hilisemaid vaatlusi, ei tohiks järgneva 14 päeva jooksul ainet manustada, et kontrollida mürgistusnähtudest paranemist või nende püsivust. Kokkupuute kestus peaks olema vähemalt kuus tundi päevas.

Testaine tuleks kanda ühtlaselt alale, mis moodustab ligikaudu 10 % kogu kehapinnast. Väga mürgiste ainete puhul võib katta väiksema osa kehapinnast, kuid võimalikult suur osa pinnast tuleks katta võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Testainet tuleks kokkupuuteperioodi jooksul hoida poorse marlisideme ja mitteärritava kleeplindi abil naha vastas. Manustamiskoht tuleks veel lisaks sobival moel kinni katta, et hoida marlisidet ja testainet paigal ja vältida testaine allaneelamist katselooma poolt. Et vältida testaine allaneelamist, võib kasutada looma liikuvust piiravaid vahendeid, kuid looma täielikku fikseerimist ei soovitata. Kasutada võib ka kaitsekraed.

Kokkupuuteperioodi lõpus tuleks testaine jääk nahalt võimaluse korral veega või muu sobiva puhastusmeetodi abil eemaldada.

Kõiki loomi tuleb iga päev jälgida ja registreerida kõik mürgistusnähud ja nende ilmnemise aeg, raskusaste ja kestus. Vaadelda tuleks muutusi nii nahas ja karvkattes, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vereringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Loomi tuleks iga nädal kaaluda. Soovitatav on iga nädal mõõta ka toidu tarbimist. Loomi tuleb regulaarselt vaadelda, et võimaluse piirides vältida loomade kadu sellistel põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade kaotsiminek nende ümberpaigutamisel. Uuringuperioodi lõpus surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad, v.a satelliitrühma loomad. Surevad ja tõsistes kannatustes või valudes loomad tuleks avastamisel kõrvaldada, humaanselt surmata ja lahata.

Kõigile loomadele, sh kontrollrühma loomadele, tehakse katseperioodi lõpus järgmine uuring:

1) hematoloogia, sealhulgas vähemalt hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja suhtarv ja hüübimisvõime;

2) kliiniline verebiokeemia, sh vähemalt üks maksa ja neerude funktsiooni parameeter: alaniini aminotransferaas (varem tuntud glutamaatpüruvaadi transaminaasina), seerumi aspartaadi aminotransferaas (varem tuntud glutamaatoksaloatsetaadi transaminaasina, kusiainelämmastik, albumiin, kreatiniin, üldbilirubiin ja seerumi üldvalk.

Muud analüüsinäidud, mida võib pädeva toksikoloogilise hinnangu andmiseks vaja minna, on järgmised: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, veresuhkur (tühja kõhuga), lipiidianalüüs, hormoonid, happe/aluse tasakaal, methemoglobiin ja koluni esteraasi aktiivsus.

▼B

Vajaduse korral võib vaadeldava toime põhjalikumaks uurimiseks kasutada täiendavaid kliinilisi biokeemilisi näitajaid.

1.6.4. **Üldlahang**

Kõik katseloomad tuleks üleni lahata. Vähemalt maks, neerud, neerupealised ja munandid tuleks kohe pärast lahti lõikamist kuivamise vältimiseks märjalt kaaluda. Elundid ja koed, st normaalne ja töödeldud nahk, maks, neerud, põrn, munandid, neerupealised, süda ja muud sihtelundid (see tähendab makropatoloogiliste kahjustustega või muutunud suurusega elundid) tuleks säilitada sobivas keskkonnas võimaliku hilisema histopatoloogilise uuringu jaoks.

1.6.5. **Histopatoloogiline uuring**

Kõrgeima annusega rühma ja kontrollrühma loomade säilitatud elundeid ja kudesid tuleks histoloogiliselt uurida. Kõrgeima annusega rühmal testainega seostatavaid kahjustusi sisaldavaid elundeid ja kudesid tuleks kontrollida ka kõigil madalama annusega rühmadel. Võimaliku satelliitrühma loomi tuleks samuti histoloogiliselt uurida, pöörates eriti tähelepanu nendele elunditele ja kudedele, milles muudes katserühmades esines muutusi.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtlikus tabelis, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selle katse algul ja igat tüüpi kahjustustega loomade arvu.

Kõiki vaatlustulemusi tuleks hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib kõiki tunnustatud statistilisi meetodeid.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— katseloomade kohta käivaid andmeid (liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne);

— katsetingimusi (sealhulgas sideme tüüpi: oklusiivside või tavaline side);

— annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga) ja kontsentratsioone;

— võimaluse korral toimeta annust;

— mürgistusnähtude andmeid soo ja annuse järgi;

— surmahetke katse ajal või seda, kas loomad jäid kuni surmamiseni ellu;

— mürgistus- või muid nähte;

— iga kõrvalekalde täheldamise aega ja kõrvalekalde hilisemat kulgu;

— sööda ja kehakaalu andmeid;

— kasutatud hematoloogilisi analüüse ja nende tulemusi;

▼B

— kasutatud kliinilise biokeemia analüüse ja nende tulemusi;

— lahkamistulemusi;

— kõigi histopatoloogiliste leidude üksikasjalikku kirjeldust;

— võimaluse korral tulemuste statistilist käsitlust;

— tulemuste analüüsi;

— tulemuste tõlgendust.

3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

4. **VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

▼M7

B.10. *IN VITRO* KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJARAKKUDEGA

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 473 (2016). See kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

In vitro kromosoomaberratsioonkatse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis põhjustavad struktuurseid kromosoomaberratsioone kultiveeritud imetajarakkudes (2–4). Struktuursed aberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatiidaberratsioonid. *In vitro* kromosoomaberratsioonkatsetes võib esineda polüploidsust (sealhulgas endoreduplikatsiooni). Kuigi aneugeenid võivad põhjustada polüploidsust, ei tõenda polüploidsus üksi aneugeenset potentsiaali ja võib lihtsalt viidata rakutsükli häirumisele või tsütotoksilisusele (5). Käesolev katse ei ole ette nähtud aneuploidsuse mõõtmiseks. Aneuploidsuse määramiseks on soovitatav kasutada mikrotuumade tekke *in vitro* katset (6).

In vitro kromosoomaberratsioonkatses võib kasutada inimrakkude või näriliste rakkude püsirakuliine või primaarseid rakukultuure. Kasutatavad rakud valitakse rakukultuuris kasvamise võime, karüotüübi (sh kromosoomiarvu) stabiilsuse ja spontaansete kromosoomaberratsioonide sageduse alusel (7). Praegu olemasolevad andmed ei võimalda anda kindlaid soovitusi, kuid nende alusel võib eeldada, et keemiliste ohutegurite hindamisel on oluline võtta arvesse katseks valitud rakkude *p53* staatust, geneetilist (karüotüübi) stabiilsust, DNA reparatsiooni võimet ja päritolu (näriliste või inimpäritolu rakud). Seega soovitatakse käesoleva katsemeetodi kasutajatel indutseeritud kromosoomaberratsioonide tekke määramiseks võtta arvesse neid ja – valdkonna teadmiste lisandumisel – muid rakuliini toimimist mõjutavaid rakulisi näitajaid.

Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

In vitro katsete puhul tuleb üldjuhul kasutada eksogeenset metaboolse aktivatsiooni allikat, välja arvatud juhul, kui rakud metaboliseerivad uuritavaid kemikaale. Eksogeenne metaboolse aktivatsiooni süsteem ei ole täielikult samastatav *in vivo* tingimustega. Hoolikalt tuleb vältida tingimusi, mis võivad põhjustada valepositiivseid tulemusi, st neid kromosoomikahjustusi, mida ei põhjusta uuritavate kemikaalide ja kromosoomide vaheline vahetu interaktsioon; sellised tingimused hõlmavad pH või osmolaalsuse muutusi (8–10), söötme koostisosadega reageerimist (11, 12) või liiga suurt tsütotoksilisust (13–16).

Käesolevat katsemeetodit kasutatakse selliste kromosoomaberratsioonide määramiseks, mida võivad põhjustada klastogeensed protsessid. Kromosoomaberratsioonide teket tuleb analüüsida metafaasi rakkudes. Seega on oluline, et nii kemikaaliga töödeldud kui ka töötlemata rakkude puhul oleksid rakud jõudnud mitoosi. Käesoleva katsemeetodi kohandamiseks tehislike nanomaterjalide uurimiseks võib vaja minna erimeetmeid, kuid neid ei ole käesolevas katsemeetodis kirjeldatud.

Enne kui kasutada seda meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

▼M7

KATSE PÕHIMÕTE

Inimrakkude või muud päritolu imetajarakkude kultuurid lastakse uuritava kemikaaliga kokku puutuda nii metaboolse aktivatsiooni eksogeense allika juuresolekul kui ka ilma selleta, välja arvatud juhul, kui kasutatakse piisava metaboliseerimisvõimega rakke (vt punkt 13). Asjakohaste ettenähtud ajavahemike järel pärast rakkude kokkupuudet uuritava kemikaaliga töödeldakse neid rakutsüklit metafaasis peatava kemikaaliga (nt koltsemiid või kolhitsiin), rakud kogutakse, värvitakse ning metafaasis rakke analüüsitakse mikroskoopiliselt kromatiid- või kromosoomaberratsioonide esinemise suhtes.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistus

Rakud

On võimalik kasutada mitmeid rakuliine (nt hiina hamstri munasarjarakuliin (CHO), hiina hamstri kopsurakuliin V79, hiina hamstri kopsurakuliin (CHL/IU), rakuliin TK6) või primaarkultuuri, sh inimese või teiste imetajate perifeerse vere lümfotsüüte (7). Rakuliinide valikut tuleb teaduslikult põhjendada. Kui kasutatakse primaarseid rakke, tuleb loomade heaolu huvides kaaluda inimpäritolu rakukultuuride kasutamist kõigil juhtudel, kui rakkude kättesaadavus on probleemitu ja proovivõtt on kooskõlas inimuuringute eetika põhimõtete ja nõuetega. Inimese perifeerse vere lümfotsüüte tuleks võtta noortelt (umbes 18–35aastastelt) mittesuitsetavatelt isikutelt, kellel ei ole teadaolevaid haigusi ning kes ei ole hiljuti kokku puutunud genotoksiliste teguritega (nt kemikaalid, ioniseeriv kiirgus) koguses, mis võiks suurendada kromosoomaberratsioonide esinemist katse foonis. See tagaks, et kromosoomaberratsioonide esinemissagedus foonis on väike ja püsiv. Kromosoomaberratsioonide esinemissageduse lähtetase suureneb vanusega ja see trend on rohkem väljendunud naistel kui meestel (17, 18). Kui eri doonoritelt kogutud rakud ühendatakse üheks prooviks, tuleb esitada doonorite arv. On vaja tõendada, et rakud on pärast uuritava kemikaaliga töötlemise alustamist kuni proovi võtmiseni jagunenud. Rakukultuure hoitakse eksponentsiaalse kasvu faasis (rakuliinid) või stimuleeritakse rakkude jagunemist (lümfotsüütide primaarkultuurid), et saada rakke rakutsükli eri faasidest, sest eri faasides olevate rakkude tundlikkus uuritava kemikaali suhtes võib olla teadmata. Primaarsed rakud, mida tuleb jagunemiseks stimuleerida mitogeenidega, ei ole uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal tavaliselt enam sünkroniseeritud (nt inimese lümfotsüüdid pärast 48tunnist stimulatsiooni mitogeeniga). Kemikaaliga töötluse ajal ei soovitata sünkroniseeritud rakkude kasutamist, kuid see võib olla aktsepteeritav, kui see on põhjendatud.

Söötmed ja kultiveerimistingimused

Rakukultuuride jaoks tuleb kasutada asjakohast söödet ja asjakohaseid inkubeerimistingimusi (kasvunõud, sobiva õhuniiskuse juures 5 % CO_2 atmosfääris (kui asjakohane), inkubeerimistemperatuur 37 °C). Rakuliine tuleb tavapraktika korras kontrollida modaalse kromosoomiarvu stabiilsuse ning mükoplasmaga saastumise puudumise suhtes (7, 19); saastunud rakke või rakke, mille modaalne kromosoomiarv on muutunud, ei kasutata. Katselaboris kasutatavate rakuliinide ja primaarkultuuride puhul tuleb teha kindlaks normaalne rakutsükliks kuluv aeg ja see peab vastama rakkude kohta avaldatud iseloomulikele näitajatele (20).

Rakukultuuride ettevalmistamine

Rakuliinid: rakke kasvatatakse tüvikultuurist, külvates neid söötmesse sellise tihedusega, et rakud jätkaksid nii suspensioonis kui ka monokihina eksponentsiaalset kasvamist kuni nende kogumiseni (nt monokihina kasvavate rakkude puhul tuleb konfluentsust vältida).

▼M7

Lümfotsüüdid: antikoagulandiga (nt hepariin) töödeldud täisverest eraldatud lümfotsüüte kasvatatakse (nt 48 tundi inimese lümfotsüütide puhul) mitogeeni juuresolekul (nt fütohemaglutiniin (PHA) inimese lümfotsüütide puhul)), et indutseerida rakkude jagunemist enne nende töötlemist uuritava kemikaaliga.

Metaboolne aktivatsioon

Eksogeenseid metaboliseerivaid süsteeme tuleb kasutada juhul, kui kasutatavate rakkude endogeenne metaboliseerimisvõime on ebapiisav. Kui ei ole teisiti põhjendatud, soovitatakse vaikevalikuna kõige sagedamini kasutatavat süsteemi, milleks on näriliste (tavaliselt roti) maksast valmistatud postmitokondriline fraktsioon S9, millele on lisatud kofaktor ning mida on töödeldud ensüümide induktoritega, nagu Aroclor 1254 (21–23) või fenobarbitaali ja β-naftoflavooni kombinatsiooniga (24–29). Viimane ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (*Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*) (30) ning on mitme funktsiooniga oksüdaaside induktorina osutunud sama tõhusaks kui Aroclor 1254 (24–28). S9-fraktsiooni kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonivahemikus 1–2 % (mahuprotsent), kuid kontsentratsiooni võib suurendada 10 %-ni (mahuprotsent) katse lõplikus söötmes. Tooteid, mis vähendavad mitoosiindeksit, eriti kaltsiumiga komplekse moodustavaid tooteid (31) tuleb vältida töötlemise ajal. Uuritavate kemikaalide klass võib mõjutada kasutatava eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi või ensüümi induktori tüübi ja kontsentratsiooni valikut.

Uuritava kemikaali preparaadi valmistamine

Enne rakkude töötlemist tuleb tahke uuritav kemikaal lahustada sobivas lahustis ja vajaduse korral lahjendada (vt punkt 23). Uuritavat kemikaali, mis on vedelik, võib lisada katsesüsteemile vahetult ja/või lahjendada enne katsesüsteemile lisamist. Gaasi või lenduva kemikaali kasutamiseks katsetes tuleb katse-eeskirja asjakohaselt muuta, näiteks teha kemikaaliga töötlemine suletud anumas (32–34). Uuritava kemikaali preparaadid tuleb valmistada vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui nende stabiilsuse andmetest nähtub, et neid võib säilitada.

Katsetingimused

Lahustid

Lahusti tuleb valida nii, et uuritavate kemikaalide lahustuvust saaks parandada, ilma et see moonutaks katse käiku (nt muudaks rakkude kasvukiirust, muudaks uuritavat kemikaali, reageeriks rakkude kasvunõuga, kahjustaks metaboolse aktivatsiooni süsteemi). Kui see on vähegi võimalik, on esimese võimalusena soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti (või söötme) kasutamist. Tavalised lahustid on näiteks vesi või dimetüülsulfoksiid. Üldjuhul ei tohiks töötlusetapis kasutatavas lõppsöötmes orgaanilise lahusti sisaldus ületada 1 % (mahuprotsent) ja vesilahustuva lahusti (füsioloogiline lahus või vesi) sisaldus ei tohiks ületada 10 % (mahuprotsent). Kui kasutatakse muid kui tavaliselt kasutatavaid lahusteid (nt etanooli või atsetooni), tuleb esitada andmed, millest nähtuks nende kokkusobivus uuritava kemikaali ja katsesüsteemiga ning genotoksilise toime puudumine kasutatud kontsentratsioonis. Nende tugiandmete puudumisel on oluline lisada lahustiga töötlemata kontrollid (vt 1. liide), et tõendada valitud lahustil kahjuliku või klastogeense toime puudumist.

Rakkude paljunemise ja tsütotoksilisuse mõõtmine ning uuritava kemikaali kontsentratsioonide valimine

Uuritava kemikaali suurimat kontsentratsiooni määrates tuleb vältida kontsentratsioone, mis võivad põhjustada valepositiivseid tulemusi, nagu kontsentratsioonid, millel avaldub liiga suur tsütotoksilisus (vt punkt 22), söötmes sadestumine (vt punkt 23) või oluline pH või osmolaalsuse muutus (vt punkt 5). Kui kemikaal

▼M7

muudab lisamise hetkel oluliselt söötme pH-d, võib pH-d reguleerida töötlusetapis kasutatavat lõppsöödet puhverdades, et vältida valepositiivseid tulemusi ja säilitada asjakohased rakkude kasvutingimused.

Mõõdetakse rakkude paljunemist, et veenduda selles, et piisav arv töödeldud rakke on katse ajal jõudnud mitoosi ja et töötlused tehakse asjakohasel tsütotoksilisuse tasemel (vt punktid 18 ja 22). Tsütotoksilisust tuleb põhikatses määrata nii metaboolse aktivatsiooni süsteemi juuresolekul kui ka ilma selleta, kasutades asjakohaseid meetodeid raku surma ja kasvu tuvastamiseks. Kuigi tsütotoksilisuse hindamine eelkatses võib osutuda kasulikuks, et paremini määrata põhikatses kasutatavad kontsentratsioonid, ei ole eelkatse tegemine kohustuslik. Kui tsütotoksilisust hinnatakse eelkatses, ei asenda need tulemused tsütotoksilisuse mõõtmist põhikatses.

Asjakohased meetodid tsütotoksilisuse hindamiseks tsütogeneetilistes katsetes on rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine (*relative population doubling*, RPD) või rakkude arvu suhteline suurenemine (*relative increase in cell count*, RICC) (13, 15, 35, 36, 55) (vt arvutusvalemid, 2. liide). Pikaajalise töötluse korral ja juhul, kui proovide võtmise aeg pärast kemikaaliga töötlemise algust ületab 1,5 korda rakutsükli kestust (st on pikem kui 3 rakutsüklit kokku), võib RPD kaudu tsütotoksilisust alahinnata (37). Neil tingimustel võib RICC olla parem mõõtmisvahend; RPD abil saaks tsütotoksilisuse kasuliku hinnang pärast 1,5 normaalse rakutsükli pikkusele vastava aja möödumist.

Lümfotsüütide primaarkultuuri puhul on tsütotoksilise/tsütostaatilise toime mõõduks mitoosiindeks (MI), kuigi seda mõjutavad kemikaaliga töötluse järel möödunud aeg, kasutatud mitogeen ja rakutsükli võimalik katkestus. Mitoosiindeks on sellele vaatamata aktsepteeritav, sest muud tsütotoksilisuse mõõtmised võivad osutuda töömahukateks ja ebapraktiliseks ning neid ei saa kohaldada PHA-stimulatsiooni tagajärjel kasvavale lümfotsüütide populatsioonile.

Kuigi rakuliinide puhul on RICC ning RPD ja primaarse rakukultuuri puhul mitoosiindeks soovitatavad tsütotoksilisuse näitajad, võib kasulikku lisateavet saada ka muude näitajate (nt rakkude terviklikkus, apoptoos, nekroos, rakutsükkel) põhjal.

Lahusti kontrolli ja positiivset kontrolli kaasa arvamata tuleb hinnata vähemalt kolme katsekontsentratsiooni, mis vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele (asjakohane tsütotoksilisus, rakkude arv jne). Sõltumata rakuliigist (rakuliinid või lümfotsüütide primaarkultuur) võib iga kontsentratsiooniga töödelda kas paralleelselt mitut või ainult ühte rakukultuuri. Kuigi soovitatav on kasutada paralleelkultuure, võib ka üksikkultuuride kasutamist aktsepteerida eeldusel, et nii ühe kui ka paralleelkultuuride puhul hinnatakse kokku ühesugune arv rakke. Üksikkultuuride kasutamine on eriti asjakohane, kui hinnatakse rohkem kui 3 kontsentratsiooni (vt punkt 31). Konkreetse kontsentratsiooniga sõltumatutest paralleelkultuuridest saadud tulemused võib andmeanalüüsiks kokku arvestada (38). Uuritavate kemikaalide puhul, mille tsütotoksilisus on väike või millel see puudub, on tavaliselt sobivad kahe- kuni kolmekordsed kontsentratsiooniintervallid. Tsütotoksilisuse avaldumise korral peavad katseks valitud kontsentratsioonid katma

▼M7

vahemiku alates kontsentratsioonist, millel avaldub tsütotoksilisus (nagu on kirjeldatud punktis 22), ja hõlmama kontsentratsioonid, millel esineb mõõdukas ja väike (või olematu) tsütotoksilisus. Paljudel uuritavatel kemikaalidel on kontsentratsiooni-toime sõltuvuse kõver järsu tõusuga ja selleks, et saada andmeid vähese või mõõduka tsütotoksilisuse kohta või et uurida doosi-toime seost üksikasjalikult, tuleb kasutada väiksema intervalliga kontsentratsioone ja/või enam kui kolme kontsentratsiooni (üks kultuur või mitu paralleelkultuuri), eriti olukorras, kui vajatakse korduskatset (vt punkt 47).

Kui maksimumkontsentratsioon põhineb tsütotoksilisusel, on suurima kontsentratsiooni puhul eesmärk saavutada 55 ± 5 % tsütotoksilisust, soovitatavate tsütotoksilisuse näitajate (st RICC ja RPD vähenemine rakuliinide puhul ning mitoosiindeksi vähenemine lümfotsüütide primaarkultuurides kuni 45 ± 5 % võrreldes samaaegse negatiivse kontrolliga) põhjal. Hoolikas tuleb olla nende positiivsete tulemuste tõlgendamisel, mis esinevad ainult selle 55 ± 5 % tsütotoksilisuse vahemiku ülemises osas (13).

Halvasti lahustuva uuritava kemikaali puhul, mis ei ole tsütotoksiline kontsentratsioonidel, mis on väiksemad kui kõige väiksem kontsentratsioon, millel kemikaal ei lahustu, peab suurim analüüsitav kontsentratsioon kemikaaliga töötluse lõpus alati tekitama hägususe või silma või invertmikroskoobiga nähtava sademe. Isegi kui tsütotoksilisus avaldub suuremal kontsentratsioonil kui vähim kontsentratsioon, millel kemikaal ei lahustu, on soovitatav teha katse ainult ühe sellise kontsentratsiooniga, millel tekib hägusus või nähtav sade, sest sade võib toimet moonutada. Sademe moodustumise kontsentratsioonil tuleb hoolikalt veenduda, et sade ei mõjuta katse tegemist (nt värvimist või hindamist). Kasulikuks võib osutuda kemikaali lahustuvuse määramine söötmes enne katsega alustamist.

Kui ei sadet ega piiravat tsütotoksilisust ei täheldata, peab suurim kontsentratsioon katses vastama vähimale kontsentratsioonile järgmistest: 10 mM, 2 mg/ml või 2 µl/ml (39-41). Kui uuritava kemikaali koostis ei ole määratav, nt tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogiline materjal (UVCB) (42), keskkonnast saadud ekstrakt vms, võib iga koostisosa kontsentratsiooni suurendamiseks olla vajalik kasutada suuremat maksimaalset kontsentratsiooni (nt 5 mg/ml), kui sellega ei kaasne olulist tsütotoksilisust. Tuleb siiski märkida, et inimravimite suhtes võivad need nõuded olla teistsugused (43).

Kontrollid

Iga kogumise kohta tuleb ette näha ka samaaegsed negatiivsed kontrollid (vt punkt 15), milles kemikaaliga töötluseks kasutatavale söötmele lisatakse vaid lahusti ja mille rakke käideldakse muus osas samamoodi kui uuritava kemikaaliga töödeldud kultuure.

Samaaegseid positiivseid kontrolle on vaja, et tõendada labori pädevust kasutatud katsemetoodika tingimustel tuvastada klastogeene ning (vajaduse korral) eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhusust. Positiivsete kontrollide näited on esitatud allpool tabelis 1. Kui see on põhjendatud, võib kasutada alternatiivseid positiivse kontrolli kemikaale. Kuna *in vitro* genotoksilisuse katsed imetajarakkudega on piisavalt standarditud, võib positiivsete kontrollide osas piirduda metaboolset aktivatsiooni vajava klastogeeni kasutamisega. Eeldusel, et kontroll tehakse samaaegselt aktiveerimata katsega, kasutades töötluseks sama kestust, nähtub sellest ainsast reaktsioonist positiivsele kontrollile nii metaboolse aktivatsiooni süsteemi aktiivsus kui ka katsesüsteemi tundlikkus. Pikaajalise töötluse jaoks (ilma S9-fraktsioonita) peab siiski olema oma positiivne kontroll, sest töötluse kestus erineb sellest, mida kasutatakse metaboolse aktivatsiooniga katses. Iga positiivse kontrolli kemikaali tuleb kasutada ühel või enamal kontsentratsioonil, mis eelduse kohaselt põhjustab fooniga võrreldes korratava ja määratava suurenemise, et näidata katsesüsteemi tundlikkust (st toime on selge, kuid ei paljasta hindajale kohe, millise proovi või kontrolliga on kodeeritud kromosoomipreparaatide puhul tegemist), ning vastusreaktsiooni ei tohi moonutada tsütotoksilisus, mis ületab selles katsemeetodis ettenähtud piire.

▼M7

Tabel 1.

Labori pädevuse hindamiseks ja positiivsete kontrollide valikuks soovitatavad võrdluskemikaalid

Kategooria	Kemikaal	CASi nr
1. Metaboolse aktivatsioonita toimivad klastogeenid		
	Metüülmetaansulfonaat	66-27-3
	Mitomütsiin C	50-07-7
	4-nitrokinoliin-*N*-oksiid	56-57-5
	Tsütosiinarabinosiid	147-94-4
2. Metaboolset aktivatsiooni vajavad klastogeenid		
	Benso[a]püreen	50-32-8
	Tsüklofosfamiid	50-18-0

KATSE KÄIK

Uuritava kemikaaliga töötlemine

Paljunevaid rakke töödeldakse uuritava kemikaaliga nii metaboolse aktivatsiooni süsteemi juuresolekul kui ka ilma selleta.

Rakkude kogumise aeg

Negatiivse tulemuse kohta järelduse tegemiseks võib vaja minna põhjalikku hindamist, milleks tuleb katsed läbi viia, kasutades kõiki kolme eri katsetingimustega olukorda: lühiajaline töötlemine kemikaaliga koos metaboolse aktivatsiooniga ja ilma selleta ning pikaajaline töötlemine kemikaaliga ilma metaboolse aktivatsioonita (vt punktid 43–45).

— Rakud tuleb 3–6 tunniks viia kokkupuutesse uuritava kemikaaliga ilma metaboolse aktivatsioonita ja koguda need prooviks ajapunktis, mis vastab umbes 1,5 normaalsele rakutsükli kestusele töötlemise algusest arvates (18).

— Rakud tuleb 3–6 tunniks viia kokkupuutesse uuritava kemikaaliga metaboolse aktivatsiooni tingimustes ja koguda need prooviks ajapunktis, mis vastab umbes 1,5 normaalsele rakutsükli kestusele töötlemise algusest arvates (18).

— Rakud tuleb viia kemikaaliga pidevasse kokkupuutesse ilma metaboolse aktivatsioonita kuni proovi kogumise ajani, mis vastab umbes 1,5 normaalsele rakutsükli kestusele. Teatavate kemikaalide (nt nukleosiidi analoogid) toimet võib olla lihtsam määrata, kui töötlus/proovivõtuaeg on pikem kui 1,5 normaalset rakutsükli kestust (24).

Juhul kui üks eespool esitatud katsetingimustest andis positiivse tulemuse, võib muude katsetingimuste kasutamine osutuda ebavajalikuks.

Kromosoomipreparaatide valmistamine

Rakukultuure töödeldakse koltsemiidi või kolhitsiiniga tavaliselt 1–3 tunni jooksul enne kogumist. Iga rakukultuur kogutakse ja töödeldakse kromosoomipreparaatide tegemiseks eraldi. Kromosoomipreparaatide valmistamiseks töödeldakse rakud hüpotoonilise lahusega, fikseeritakse ja värvitakse. Monokihtides võib 3–6 tundi kestnud töötlemise lõpus olla mitootilisi rakke (tuvastatavad selle järgi, et on ümmargused ja irduvad kasvunõu pinnalt). Kuna mitootilised

▼M7

rakud irduvad kergesti, võib neid uuritavat kemikaali sisaldava söötme eemaldamisel kaotsi minna. Kui on tõendeid, et mitootiliste rakkude arv on kontrolliga võrreldes oluliselt suurem, mis viitab rakutsükli tõenäolisele peatumisele mitoosifaasis, tuleb rakud koguda tsentrifuugimisega ja külvata tagasi rakukultuuri, et vältida kogumise ajal kromosoomaberratsiooni tekke riskiga mitoosis olevate rakkude kaotamist.

Analüüs

Kõik mikroskoobipreparaadid, sealhulgas need, millel on positiivsed ja negatiivsed kontrollid, tuleb sõltumatult kodeerida enne kromosoomaberratsioonide esinemise mikroskoopilist analüüsi. Fikseerimine põhjustab sageli osal metafaasis rakkudest kromosoomide kadu, seetõttu tuleb hinnata vaid rakke, milles olevate tsentromeeride arv vastab modaalsele kromosoomiarvule ± 2.

Iga kontsentratsiooni ja kontrolli kohta tuleb hinnata vähemalt 300 hästi eristuvat metafaasi, et käsitada uuritavat kemikaali selgelt negatiivsena (vt punkt 45). Kui kasutatakse paralleelkultuure, peavad 300 rakku olema paralleelide vahel võrdselt jagatud. Kui kontsentratsiooni kohta kasutatakse üht rakukultuuri (vt punkt 21), tuleb selles ühes kultuuris loendada vähemalt 300 hästi eristuvat metafaasi. 300 raku loendamise eelis on, et see lisab katsele statistilist võimsust ja lisaks on tulemuseks harva nullväärtus (eeldatavasti vaid 5 %) (44). Hinnatavate metafaaside arvu vähendatakse, kui tuvastatakse suur arv kromosoomaberratsioonidega rakke ja uuritavat kemikaali käsitatakse selgelt positiivsena.

Tuleb hinnata struktuursete kromosoomaberratsioonidega, sh tühikutega ja ilma, rakke. Kromosoomikatked ja tühikud määratletakse 1. liites kooskõlas kirjandusviidetega (45, 46). Kromatiid- ja kromosoomaberratsioonid tuleb eraldi dokumenteerida ja klassifitseerida alatüüpide alusel (katked, vahetused). Labori eeskirjadega peab olema tagatud, et kromosoomaberratsioonianalüüsi teevad selleks koolitatud hindajad ning vajaduse korral kasutatakse vastastikust hindamist.

Kuigi katse eesmärk on tuvastada struktuursed kromosoomaberratsioonid, on tähtis registreerida ka polüploidsuse ja endoreduplikatsiooni sagedus juhul, kui neid täheldatakse. (Vt punkt 2.)

Labori pädevus

Katsemeetodiga piisava kogemuse saamiseks enne selle rutiinset kasutamist peab labor olema teinud katsesarju positiivse kontrolli kemikaalidega, mis toimivad teistsuguste mehhanismide kaudu, ja mitmesuguste negatiivse kontrolli kemikaalidega (kasutades erinevaid lahusteid/vehiikuleid). Nende positiivse ja negatiivse kontrolli kemikaalidega saadud reaktsioonid peavad olema kooskõlas teaduskirjanduse andmetega. Seda nõuet ei kohaldata asjakohase kogemusega laborite puhul, kui on olemas varasemate katsete põhine andmebaas, nagu on määratletud punktis 37.

Positiivseks kontrolliks valitud kemikaale (vt tabel 1, punkt 26) tuleb uurida lühi- ja pikaajalise töötlusega ilma metaboolse aktivatsioonita ning ka lühiajalise töötlusega metaboolse aktivatsiooni juuresolekul, et tõendada klastogeensete kemikaalide tuvastamiseks ja metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhususe määramiseks vajalikku pädevust. Valitud kemikaalide puhul tuleb katsesüsteemi tundlikkuse ja dünaamilise vahemiku tõendamiseks valida kontsentratsioonivahemikud nii, et oleks võimalik saada foonist suuremaid ning korratavaid ja kontsentratsioonist sõltuvaid väärtusi.

▼M7

Varasemad kontrolli andmed

Labor peab määrama:

— varasemate katsete alusel positiivse kontrolli tulemuste vahemiku ja jaotuse,

— varasemate katsete alusel negatiivse kontrolli (töötlemata proov, lahusti) tulemuste vahemiku ja jaotuse.

Kui esmakordselt hangitakse andmeid varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse määramiseks, peavad paralleelsed negatiivse kontrolli andmed olema kooskõlas kontrolli kohta avaldatud andmetega (kui need on olemas). Kui kontrolli väärtuste jaotusele lisatakse uusi katseandmeid, peaksid negatiivse kontrolli paralleelid ideaaljuhul olema selle jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 % (44, 47). Labori varasemate negatiivsete kontrollide andmebaasi koostamisel tuleb alguses kasutada vähemalt 10 katse andmeid, kuid eelistatavalt peaks andmebaas sisaldama vähemalt 20 võrreldavatel tingimustel tehtud katse andmeid. Laboritel tuleb kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, selliseid nagu kontrollkaardid (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (48)), et määrata, kui suures ulatuses positiivse ja negatiivse kontrolli andmed varieeruvad, ja tõendada, et metoodika on laboris „kontrolli all“ (44). Täiendavaid soovitusi selle kohta, kuidas koguda ja kasutada varasemate katsete andmeid (st tulemuste varasemate andmete andmebaasi võtmise või sellest väljajätmise kriteeriumid ja konkreetse katse nõuetekohasuse kriteeriumid), võib leida kirjandusest (47).

Katse-eeskirja muudatuste puhul tuleb arvestada, kas need mõjutavad andmete vastavust neile andmetele, mis on labori varem tehtud kontrollide andmebaasis olemas. Oluliste mittevastavuste korral tuleb koostada uus varasemate kontrolli andmete andmebaas.

Negatiivse kontrolli andmed peaksid hõlmama kromosoomaberratsioonidega rakkude esinemust ühes rakukultuuris või nende summat paralleelkultuuridest, nagu on kirjeldatud punktis 21. Negatiivse kontrolli paralleelide tulemused peaksid ideaaljuhul olema labori varasemate kontrolli andmete jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 % (44, 47). Kui negatiivse kontrolli paralleelide tulemused jäävad väljapoole usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %, võivad need olla varasemate kontrolli andmete jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmusliku võõrväärtusega ning on tõendatud, et katsesüsteem on „kontrolli all“ (vt punkt 37) ja ei ole tõendeid, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksitusega.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

TULEMUSTE ESITAMINE

Struktuurse(te) kromosoomaberratsiooni(de)ga rakkude osakaalu hinnatakse protsentides. Alatüüpideks klassifitseeritud kromatiid- ja kromosoomaberratsioonid (murrud, vahetused) loetletakse eraldi, esitades nende arvu ja sageduse uuritava kemikaali ja kontrolli kultuuride puhul. Tühikud registreeritakse ja nende andmed esitatakse eraldi, kuid neid ei võeta arvesse aberratsioonide üldsageduses. Polüploidsete ja/või endoreduplikatsiooniga rakkude (kui neid täheldatakse) osakaal esitatakse protsentides.

Aberratsiooni põhikatses/-katsetes tuleb registreerida kõikide uuritava kemikaaliga töödeldud, negatiivse ja positiivse kontrolli kultuuride tsütotoksilisuse paralleelmõõtmiste tulemused.

Andmed tuleb esitada iga kultuuri kohta eraldi. Lisaks tuleb tabelina esitada kõikide andmete kokkuvõte.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Katse nõuetekohasus põhineb järgmistel kriteeriumidel:

— paralleelse negatiivse kontrolli tulemused on vastuvõetavad, et lisada need labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste andmebaasi, nagu on kirjeldatud punktis 39;

▼M7

— paralleelsed positiivsed kontrollid (vt punkt 26) peavad tekitama reaktsioone, mis on võrreldavad nendega, mis on olemas varasemate positiivse kontrolli tulemuste andmebaasis, ning põhjustama statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga;

— lahustiga kontrollis peab olema täidetud rakkude paljunemise kriteerium (punktid 17 ja 18);

— katsed on tehtud kõigis kolme olukorra katsetingimustes, välja arvatud juhul, kui ühes neist on saadud positiivsed tulemused (vt punkt 28);

— rakkude arv on piisav ja kontsentratsioonid on analüüsitavad (punktid 31 ja 21);

— suurima kontsentratsiooni valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mis on kirjeldatud punktides 22–24.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt positiivsena, kui mis tahes uuritud katsetingimustes (vt punkt 28):

a) vähemalt ühel uuritud kontsentratsioonil esineb statistiliselt oluline suurenemine paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;

b) asjakohase trenditestiga hinnates nähtub, et see suurenemine sõltub annusest;

c) ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotust (nt väljaspool Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %; vt punkt 39).

Kui kõik need kriteeriumid on täidetud, järeldatakse, et kemikaal põhjustab selles katsesüsteemis kromosoomaberratsioone kultiveeritud imetajarakkudes. Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta leiab kirjandusest (49–51).

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt negatiivsena, kui kõikides uuritud katsetingimustes (vt punkt 28):

a) mitte ühelgi uuritaval kontsentratsioonil ei esine statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;

b) asjakohase trenditesti meetodiga hinnates ei esine annusest sõltuvat suurenemist;

c) kõik need tulemused on labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %; vt punkt 39).

Sel juhul järeldatakse, et kemikaal ei saa selles katsesüsteemis põhjustada kromosoomaberratsioone kultiveeritud imetajarakkudes.

Selget positiivset või selget negatiivset reaktsiooni ei ole vaja kinnitada.

Juhul, kui reaktsioon ei ole selgelt negatiivne ega selgelt positiivne, nagu eespool kirjeldatud, või selleks, et teha kindlaks tulemuse bioloogiline olulisus, hinnatakse andmeid eksperdihinnangu ja/või täiendavate uuringute abil. Kasulikuks võib osutuda lisarakkude hindamine (kui see on asjakohane) või korduskatse tegemine, võimaluse korral muudetud tingimustes (nt kontsentratsioonivahemik, teistsugused metaboolse aktivatsiooni tingimused (nt S9-fraktsiooni kontsentratsioon või S9 päritolu).

Harvadel juhtudel võivad andmed isegi pärast täiendavaid uuringuid olla positiivse või negatiivse tulemuse suhtes järelduse tegemist välistavad ning seetõttu järeldatakse, et uuritava kemikaali toime on ebaselge.

▼M7

Polüploidsete rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal võib inhibeerida mitoosi protsesse ja põhjustada kromosoomide arvu muutusi (52). Endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal võib inhibeerida rakutsükli edenemist (53, 54) (vt punkt 2). Seepärast tuleb polüploidsed rakud ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakud eraldi registreerida.

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumise kuupäev, kui olemas;

— uuritava kemikaali stabiilsus, kui teada.

— uuritava kemikaali lahustuvus ja stabiilsus lahustis, kui teada;

— lisatud uuritava kemikaaliga rakusöötme pH mõõtmine, söötme osmolaalsus ja sademe teke selles.

Ühe koostisosaga aine:

— välimus, lahustuvus vees ja täiendavad asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite keemilised nimetused vastavalt vajadusele ja praktilisele teostatavusele jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, komplekssed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:

— iseloomustatakse nii palju kui võimalik, lähtudes koostisosade keemilistest identifitseerimisandmetest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Lahusti:

— lahusti valiku põhjendus;

— samuti tuleb esitada lahusti protsendiline sisaldus lõppsöötmes.

Rakud:

— rakkude tüüp ja päritolu;

— karüotüübi omadused ja kasutatava rakutüübi sobivus;

— rakuliinide puhul: mükoplasma puudumine;

— rakuliinide puhul: teave rakutsükli kestuse, rakupopulatsiooni kahekordistumise aja või proliferatsiooniindeksi kohta;

— veredoonorite sugu, vanus ja muu asjakohane teave doonori, täisvere või eraldatud lümfotsüütide kohta, kasutatud mitogeen;

— rakuliinide puhul: passaažide arv, kui see on kättesaadav;

— rakuliinide puhul: rakukultuuride säilitamise meetodid;

— rakuliinide puhul: modaalne kromosoomiarv.

▼**M7**

Katsetingimused:

— metafaasi peatava kemikaali nimetus, kontsentratsioon ja rakkudega kokkupuute kestus;

— uuritava kemikaali kontsentratsioon, väljendatuna lõppkontsentratsioonina söötmes (nt µg või mg/ml või mM söötmes);

— kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhjendus, sealhulgas nt tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud;

— söötme koostis; CO_2 kontsentratsioon, kui asjakohane, niiskusesisaldus;

— söötmele lisatud lahusti ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (ja/või ruumala);

— inkubatsioonitemperatuur;

— inkubatsiooniaeg;

— uuritava kemikaaliga töötlemise kestus;

— pärast töötlemist rakkude kogumise aeg;

— rakkude külvitihedus, vajaduse korral;

— metaboolse aktivatsiooni süsteemi tüüp ja koostis (S9-fraktsiooni allikas, S9-fraktsiooni segu valmistamise meetod, S9-fraktsiooni segu ja S9-fraktsiooni kontsentratsioon ja ruumala lõppsöötmes, S9-fraktsiooni kvaliteedikontrollid);

— positiivseks ja negatiivseks kontrolliks kasutatud kemikaalid, nende lõppkontsentratsioonid iga töötluse tingimuste puhul;

— mikroskoobipreparaatide valmistamise meetodid ja kasutatud värvimismeetodid;

— katsete nõuetekohasuse kriteeriumid;

— aberratsioonide hindamise kriteeriumid;

— analüüsitud metafaaside arv;

— tsütotoksilisuse mõõtmise meetodid;

— muu täiendav asjakohane teave tsütotoksilisuse ja kasutatud meetodi kohta;

— kriteeriumid, mille alusel uuringutulemust käsitatakse positiivse, negatiivse või ebaselgena;

— pH, osmolaalsuse ja sadenemise määramiseks kasutatud meetodid.

Tulemused:

— töödeldud rakkude arv ja kogutud rakkude arv iga rakukultuuri kohta, kui kasutatakse rakuliine;

— tsütotoksilisuse mõõtmise tulemused, nt RPD, RICC, MI või muud vaatlusandmed, kui on olemas;

— rakutsükli kestuse, rakupopulatsiooni kahekordistumise aja või proliferatsiooniindeksi andmed rakuliinide puhul;

— sademe tekke tunnused ja määramise aeg;

▼M7

— aberratsioonide, sh tühikute määratlemine;

— loendatud rakkude arv, kromosoomaberratsioonidega rakkude arv ning kromosoomaberratsioonide arv tüübiti eraldi iga töödeldud või kontrolli kultuuri kohta, tühikuid arvestades või välja jättes;

— ploidsuse muutused (polüploidsed rakud ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakud esitada eraldi), kui neid täheldati;

— kontsentratsiooni-toime vaheline seos, kui võimalik;

— paralleelse negatiivse (lahusti) ja positiivse kontrolli andmed (kontsentratsioonid ja lahustid);

— varasemad negatiivse ja positiivse kontrolli andmed, sh vahemik, keskväärtused, standardhälbed ja jaotuse usaldusvahemik usaldatavustasemel 95 %, samuti selliste andmete arv;

— statistiline analüüs; p-väärtused, kui olemas.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

KIRJANDUS

(1) OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.

(2) Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens“, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York ja London, pp. 1–29.

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), „The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture“, in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-NewYork-Oxford, pp. 427–432.

(4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), „Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, kd 10/suppl. 10, pp. 1–175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), „Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318–327.

(6) Käesoleva lisa peatükk B.49, „*Mikrotuumade tekke in vitro katse imetajarakkudega“*.

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, „Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing“.

(8) Scott, D. *et al*. (1991), „Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9“, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 257/2, pp. 147–204.

(9) Morita, T. *et al*. (1992), „Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297–305.

(10) Brusick, D. (1986), „Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations“, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, pp. 789–886.

▼**M7**

(11) Long, L.H. *et al*. (2007), „Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1–2, pp. 177–183.

(12) Nesslany, F. *et al*. (2008), „Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439–452.

(13) Galloway, S. (2000), „Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191–201.

(14) Kirkland, D. *et al*. (2005), „Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, kd 584/1–2, pp. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al*. (2004), „Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. *et al*. (1998), „Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.

(17) Hedner K. *et al*. (1982), „Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex“, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305–309.

(18) Ramsey M.J. *et al*. (1995), „The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting“, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95–106.

(19) Coecke S. *et al*. (2005), „Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice“, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261–287.

(20) Henderson, L. *et al*. (1997), „Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies“, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp. 163–167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), „Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347–363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), „Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3–4, pp. 173–215.

(23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), „Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes“, *Mutation Research*, Vol. 37/1, pp. 83–90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), „Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277–290.

(25) Ong, T.-M. *et al*. (1980), „Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver“, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55–65.

(26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), „Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays“, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175–177.

▼**M7**

(27) Matsushima, T. *et al*. (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, väljaandes *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.

(28) Galloway, S.M. *et al*. (1994), „Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241–261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), „Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9“, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* kd 28/1, pp. 51–59.

(30) UNEP (2001), *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP)* (Püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon, ÜRO keskkonnaprogramm (UNEP)). Kättesaadav aadressil: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), „Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes“, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225–8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, väljaandes *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91–103.

(33) Zamora, P.O. *et al*. (1983), „Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795–801.

(34) Asakura, M. *et al*. (2008), „An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay“, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122–130.

(35) Lorge, E. *et al*. (2008), „Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1–2, pp. 1–3.

(36) Galloway, S. *et al*. (2011), „Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus)“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77–83.

(37) Honma, M. (2011), „Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1–2, pp. 86–87.

(38) Richardson, C. *et al*. (1989), „Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays“, *In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–154.

(39) OECD (2014), „Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487)“, ENV/JM/TG(2014)17. Nõude esitamisel kättesaadav.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), „Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity“, *Mutation Research/-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1–2, pp. 32–56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), „Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay“, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, pp. 36–43.

▼**M7**

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), *Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances*, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), *International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use*. Kättesaadav aadressil: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 198*, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al*. (1990), „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*“, *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62–86.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), „Compilation and use of genetic toxicity historical control Data“, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. *et al*. (1987), „Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1–175.

(51) Richardson, C. *et al*. (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays“, *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), „A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens“, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29–46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), „Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest“, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403–413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), „Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells“, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362–1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), „Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test“, *Mutation Res*earch, Vol. 312, pp. 139–149.

▼M7

1. liide

MÕISTED

Aneuploidsus – iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidsus).

Apoptoos – programmeeritud rakusurm, mida iseloomustab rida etappe, mis viivad raku lagunemiseni membraaniga seotud osakesteks, mis kõrvaldatakse fagotsütoosiga või osakeste raku membraanilt koorumise teel (*shedding*).

Endoreduplikatsioon – protsess, milles pärast DNA replikatsiooni S-perioodi ei käivitu rakutuumas mitoos, vaid algab uus S-periood. Selle tulemusena tekivad kromosoomid, milles on 4, 8, 16, … kromatiidi.

Genoommutatsioon – kasutatud rakkude normaalse kromosoomiarvu muutus.

Genotoksiline – üldtermin, mis hõlmab kõiki DNA või kromosoomi kahjustuse tüüpe, sealhulgas murde, deletsioone, adukte, nukleotiidide modifikatsioone ja sidemete teket, ümberpaigutusi, geenimutatsioone, kromosoomaberratsioone ja aneuploidsust. Mitte kõik genotoksiliste toimete tüübid ei põhjusta mutatsioone või püsivat kromosoomikahjustust.

Kemikaal – aine või segu.

Klastogeen – iga kemikaal, mis tekitab rakkude või eukarüootsete organismide populatsioonides struktuurseid kromosoomaberratsioone.

Kontsentratsioonid – tähendavad uuritava kemikaali lõppkontsentratsioone söötmes.

Kromatiidaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub üksikkromatiidide katkemisena või kromatiidide katkemise ja nendevahelise taasühinemisena.

Kromatiidi tühik – üksikkromatiidi värvumata (akromaatiline) piirkond, mille puhul kromatiidi lineaarses struktuuris tekkinud nihe on minimaalne.

Kromatiidimurd – üksikkromatiidi terviklikkuse selline katkemine, millega kaasneb ühe kromatiidi lineaarses struktuuris selge nihe.

Kromosoomaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub mõlema kromatiidi katkemisena või katkemise ja taasühinemisena samas kohas.

Lahusti kontroll – üldtermin, millega tähistatakse kontrollikultuure, millele lisatakse ainult uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahusti.

Maksa S9-fraktsioon – maksa homogenaadi supernatant, mis on eraldatud pärast tsentrifuugimist 9000g juures, st maksa toorekstrakt.

Mitoos – rakutuuma jagunemine, mis tavaliselt jagatakse profaasiks, prometafaasiks, metafaasiks, anafaasiks ja telofaasiks.

Mitoosiindeks (MI) – suhtarv, mis saadakse, kui vaatlusaluse rakupopulatsiooni metafaasis olevate rakkude arv jagatakse rakkude koguarvuga; on selle rakupopulatsiooni proliferatsioonitaseme näitaja.

▼M7

Mutageenne – tekitab päriliku muutuse geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomaberratsioonid).

p53 staatus – p53 on valk, mis on seotud rakutsükli, apoptoosi ja DNA reparatsiooni reguleerimisega. Teoreetiliselt peaksid geenimutatsioonid või kromosoomaberratsioonid kergemini tekkima rakkudes, milles puudub funktsionaalne p53-valk ja mis seetõttu ei ole võimelised rakutsüklit peatama või kõrvaldama kahjustunud rakke apoptoosi või muude mehhanismide, nt DNA reparatsiooni indutseerimise kaudu, mille käivitab DNA kahjustus ja mis on seotud p53 funktsioonidega.

Polüploidsus – rakkude või organismi selline genoommutatsioon, mis hõlmab terveid kromosoomistikke, erinevalt aneuploidsusest, mille puhul on muutunud üksikute kromosoomide arv.

Rakkude arvu suhteline suurenemine (*Relative Increase in Cell Count*, RICC) – kemikaaliga kokku puutunud rakukultuuris rakkude arvu suurenemine, võrreldes töötlemata kultuuriga; suhtarv väljendatakse protsentides.

Rakkude paljunemine – rakkude arvu suurenemine mitootilise rakujagunemise tagajärjel.

Rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine (*Relative Population Doubling*, RPD) – kemikaaliga kokku puutunud rakukultuuris rakupopulatsiooni kahekordistumise kordade suurenemine, võrreldes töötlemata kultuuriga; suhtarv väljendatakse protsentides.

S9-fraktsiooni segu – S9-fraktsiooni ja metaboolsete ensüümide aktiivsuse jaoks vajalike kofaktorite segu.

Struktuurne aberratsioon – raku jagunemise metafaasi etapis mikroskoopiliselt tuvastatav kromosoomi struktuuri muutus, mida nähakse deletsioonide ja fragmentidena, inversioonide või kromosoomivaheliste translokatsioonidena.

Tsütotoksilisus – käesoleva katsemeetodi kohaselt rakuliinidega tehtud katsetes määratletakse tsütotoksilisus rakupopulatsiooni suhtelise kahekordistumise (RPD) või rakkude arvu suhtelise suurenemise (RICC) vähenemisena töödeldud rakkudes negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punkt 17 ja 2. liide). Käesoleva katsemeetodi kohaselt lümfotsüütide primaarkultuuridega tehtud katsetes määratletakse tsütotoksilisus töödeldud rakkude mitoosiindeksi vähenemisena negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punkt 18 ja 2. liide).

Töötlemata kontroll – paralleelsed rakukultuurid, mida ei ole töödeldud (st ei uuritava kemikaali ega lahustiga), kuid mida on käideldud samaaegselt samal viisil kui uuritava kemikaaliga töödeldud rakukultuure.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M7

2. liide

TSÜTOTOKSILISUSE HINDAMISE VALEMID

Mitoosiindeks (MI) –

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Mitoosis olevate rakkude arv}}{\text{Loendatud rakkude üldarv}} \times 100$$

Soovitatakse kasutada rakkude arvu suhtelist suurenemist (*Relative Increase in Cell Count*, RICC) või rakupopulatsiooni suhtelist kahekordistumist (*Relative Population Doubling*, RPD), sest mõlema puhul võetakse arvesse jagunenud rakkude osakaalu rakupopulatsioonis.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Rakkude arvu suurendamine töödeldud kultuurides}(\text{lõpparv} - \text{algusarv}))}{(\text{Rakkude arvu suurendamine kontrollkultuurides}(\text{lõpparv} - \text{algusarv}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Populatsiooni kahekordistumiste arv töödeldud kultuurides})}{(\text{Populatsiooni kahekordistumiste arv kontrollkultuurides})} \times 100$$

kus:

populatsiooni kahekordistumine = [log (rakkude arv pärast töötlust ÷ rakkude algarv)] ÷ log 2

Näiteks tähendab RICC või RPD 53 %, et tsütotoksilisus/tsütostaatilisus on 47 %, ning MI kaudu määratud tsütotoksilisus/tsütostaatilisus 55 %, et tegelik MI on kontrolli väärtusest 45 %.

Igal juhul tuleb määrata rakkude arv enne töötlust ja see peab olema sama kui rakkude arv töödeldud ja negatiivse kontrolli kultuurides.

Kuigi varem on tsütotoksilisuse näitajana kasutatud RCC-d (st rakkude arv töödeldud kultuuris / rakkude arv kontrollkultuuris), ei ole see enam soovitatav, sest sellega võib tsütotoksilisust alahinnata.

Negatiivse kontrolli kultuurides peab rakupopulatsiooni kahekordistumine olema vastavuses nõudega koguda rakud pärast töötlust ajal, mis vastab ligikaudu 1,5 normaalse rakutsükli kestusele, ja mitoosiindeks peab olema piisavalt palju suurem, et mitoosis olevate rakkude arv oleks piisav 50 % vähenemise usaldusväärseks arvutamiseks.

▼M7

B.11. **KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJATE LUUÜDIGA**

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 475 (2014). See kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

In vivo kromosoomaberratsioonkatse imetajate luuüdiga on genotoksilisuse hindamiseks eriti oluline, sest kuigi metabolismi, farmakokineetika ja DNA reparatsiooniprotsesside *in vivo* tegurid võivad liigiti erineda, on need aktiivsed ja annavad oma panuse organismi reageerimisse. Samuti võib *in vivo* katse olla kasulik *in vitro* süsteemis kindlaks tehtud genotoksilisuse täiendavaks uurimiseks.

In vivo kromosoomaberratsioonkatset imetajarakkudega kasutatakse uuritava kemikaali põhjustatud struktuursete kromosoomaberratsioonide tuvastamiseks imetajate (tavaliselt näriliste) luuüdirakkudes (2–5). Struktuursed kromosoomaberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatiidaberratsioonid. Kuigi enamik genotoksiliste kemikaalide põhjustatud aberratsioone on kromatiidaberratsioonid, esineb ka kromosoomaberratsioone. Kromosoomikahjustused ja nende tagajärjed põhjustavad mitmeid inimeste geneetilisi haigusi ning on olulisi tõendeid selle kohta, et need kahjustused ja nende tagajärjed põhjustavad muutusi onkogeenides ja tuumorsupressorgeenides ning on seotud vähktõve tekkega inimestel ja katsesüsteemides. Kromosoomaberratsiooni katsetes *in vivo* võib esineda polüploidsust (sealhulgas endoreduplikatsiooni). Polüploidsuse suurenemine ei viita siiski iseenesest aneugeensele potentsiaalile ja võib lihtsalt viidata rakutsükli häirumisele või tsütotoksilisusele. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud aneuploidsuse mõõtmiseks. Mikrotuumade tekke *in vivo* katse imetajate erütrotsüütidega (käesoleva lisa peatükk B.12) või mikrotuumade tekke *in vitro* katse imetajarakkudega (käesoleva lisa peatükk B.49) oleksid vastavalt *in vivo* ja *in vitro* katsed, mis on soovitatavad aneuploidsuse määramiseks.

Kasutatud terminitega seotud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

Kõnealuses katses kasutatakse tavaliselt närilisi, kuid mõnel juhul võib asjakohane olla teiste liikide kasutamine, kui see on põhjendatud. Selle katse sihtkude on luuüdi, sest see on väga veresoonterikas kude, milles on populatsioon kiire rakutsükliga rakke, mida on kerge eraldada ja käidelda. Katseprotokollis tuleb esitada teaduslik põhjendus, miks kasutatakse muud loomaliiki kui rott või hiir. Kui kasutatakse muud loomaliiki kui närilisi, on soovitatav, et luuüdi kromosoomaberratsioonide mõõtmine oleks integreeritud muusse asjakohasesse toksilisuse katsesse.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav kemikaal või selle metaboliit/metaboliidid ei jõua sihtkoeni, võib käesoleva katse kasutamine olla asjakohatu.

Enne kui kasutada seda meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

▼M7

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Loomade viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, kasutades asjakohast kokkupuuteviisi, ning loomad hukatakse pärast kemikaaliga töötlemist humaanselt ja õigel ajal. Enne hukkamist manustatakse loomadele mitoosi metafaasis peatavat ainet (nt kolhitsiini või koltsemiidi). Seejärel tehakse luuüdirakkudest kromosoomipreparaadid, need värvitakse ja analüüsitakse metafaasis olevate rakkude kromosoomaberratsioone.

LABORI PÄDEVUSE TÕENDAMINE

Pädevuse tõendamise katsed

Kinnitamaks, et laboril on enne katse rutiinset kasutamist katse tegemise piisav kogemus, peab labor olema tõendanud, et ta suudab korrata avaldatud tööde (nt (6)) põhjal eeldatavaid tulemusi kromosoomaberratsioonide sageduse määramisel vähemalt kahe positiivse kontrolli kemikaaliga (kaasa arvatud positiivse kontrolli kemikaalide väikeste annustega põhjustatud nõrgad reaktsioonid), vt tabel 1, ja vastava vehiikuli/lahusti kontrolliga (vt punkt 22). Nendes katsetes tuleks kasutada annuseid, mis põhjustavad reprodutseeritavaid ja annusest sõltuvaid suurenemisi ning tõendavad katsesüsteemi tundlikkust huvipakkuva koe (luuüdi) puhul, mõõtmispiirkonna ja laboris kasutatava hindamismeetodi sobivust. Seda nõuet ei kohaldata kogemusega labori puhul, see tähendab, kui laboril on varasemate katsete põhine andmebaas, nagu on määratletud punktides 10–14.

Varasemad kontrolli andmed

Pädevuse tõendamise ajal peab labor kindlaks tegema:

— varasemate katsete alusel positiivse kontrolli tulemuste vahemiku ja jaotuse ning

— varasemate katsete alusel negatiivse kontrolli tulemuste vahemiku ja jaotuse.

Kui esmakordselt hangitakse andmeid varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse määramiseks, peavad paralleelsed negatiivse kontrolli andmed olema kooskõlas kontrolli kohta avaldatud andmetega (kui need on olemas). Kui kontrolli väärtuste jaotusele lisatakse uusi katseandmeid, peaksid negatiivse kontrolli paralleelid ideaaljuhul olema selle jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %. Labori varasemate negatiivse kontrolli katsete andmebaas peaks olema statistiliselt usaldusväärne, et laboril oleks võimalik hinnata oma negatiivse kontrolli andmete jaotust. Kirjanduse põhjal läheb vaja vähemalt kümmet katset, kuid parem oleks, kui andmebaasis oleksid vähemalt 20 võrreldavates tingimustes tehtud katse tulemused. Laboritel tuleb kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, selliseid nagu kontrollkaardid (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (7)), et määrata, kui suures ulatuses andmed varieeruvad, ja tõendada, et metoodika on laboris „kontrolli all“. Täiendavaid soovitusi selle kohta, kuidas koguda ja kasutada varasemate katsete andmeid (st varasemate andmete andmebaasi võtmise või sellest väljajätmise kriteeriumid ja konkreetse katse vastuvõetavuse kriteeriumid), võib leida kirjandusest (8).

Kui labor ei tee piisavat arvu katseid, et saada statistiliselt usaldusväärne negatiivse kontrolli jaotus (vt punkt 11) pädevuskontrolli katsete käigus (kirjeldatud punktis 9), siis on lubatud selle jaotuse kindlakstegemine esimeste rutiinsete katsetega. Sellise lähenemisviisi kasutamisel tuleks järgida kirjanduses (8) esitatud soovitusi ja nendes katsetes saadud negatiivse kontrolli tulemused peaksid olema kooskõlas negatiivse kontrolli kohta avaldatud andmetega.

▼M7

Katse-eeskirja kõigi muudatuste puhul tuleb arvestada, kas need mõjutavad saadavate andmete kooskõla andmetega, mis on labori varem tehtud kontrollide andmebaasis olemas. Ainult väga vastuoluliste andmete puhul tuleks koostada uus varasemate kontrolli tulemuste andmebaas, kui eksperdihinnangu alusel tuvastatakse, et uus jaotus erineb varasemast jaotusest (vt punkt 11). Uue andmebaasi koostamise ajal ei ole konkreetse katse tegemise lubamiseks negatiivsete kontrollide täielikku andmebaasi vaja, kui labor suudab tõendada, et nende paralleelse negatiivse kontrolli väärtused on kooskõlas nende varasema andmebaasiga või vastavate avaldatud andmetega.

Negatiivse kontrolli andmetes peab iga looma kohta esitama kromosoomaberratsioonide (välja arvatud tühikute) esinemissageduse. Negatiivse kontrolli paralleelide tulemused peaksid ideaaljuhul olema labori varasemate kontrolli tulemuste jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %. Kui negatiivse kontrolli paralleelide tulemused jäävad väljapoole usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %, võivad need olla varasemate kontrolli tulemuste jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmusliku võõrväärtusega ning on tõendatud, et katsesüsteem on „kontrolli all“ (vt punkt 11) ja ei ole tõendeid, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksitusega.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Loomaliigi valimine

Kasutada tuleb tavapärastest laboriliinidest pärit terveid noori täiskasvanud isendeid. Tavaliselt kasutatakse rotte, kuigi ka hiired võivad katseks sobida. Ka mis tahes muid katseks sobivaid loomaliike võib kasutada, kui selle kohta esitatakse katseprotokollis teaduslik põhjendus.

Loomade pidamis- ja söötmistingimused

Näriliste puhul peab loomade pidamisruumi temperatuur olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks ideaaltingimustes olema 50–60 %, peab see olema vähemalt 40 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Kasutatakse tehisvalgustust, valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada labori tavapärast söödavalikut koos piiramatus koguses joogiveega. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali sobiv lisamine söödasse, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Närilisi tuleb pidada väikestes rühmades (kuni viis looma puuris), igas puuris on samast soost ja sama katserühma loomad, kui ei eeldata agressiivset käitumist; eelistatud on kõva põrandaga ja asjakohaselt mitmekesistatud keskkonnaga puurid. Loomi võib ühekaupa pidada ainult siis, kui see on teaduslikult põhjendatud.

Loomade ettevalmistamine

Tavaliselt kasutatakse terveid noori täiskasvanud loomi (näriliste puhul ideaaljuhul katse alguses 6–10nädalased loomad, kuigi lubatud on ka veidi vanemad loomad), kes jagatakse juhuvaliku alusel katse- ja kontrollirühmadesse. Iga loom saab kordumatu identimismärgistuse, mille tegemiseks kasutatakse humaanset võimalikult vähe invasiivset meetodit (nt rõngastamine, märgistamine, mikrokiipimine või biomeetriline tuvastamine, kuid mitte kõrva sälkamine või varba köndistamine) ning loomadel lastakse vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõju on võimalikult väike. Tuleb vältida ristsaastumist positiivse kontrolli ja uuritava kemikaaliga. Katse alguses peavad loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte erinema üle ±20 % kummagi soo keskmisest massist.

Annuste valmistamine

Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või vehiikulis ja segada sööda sisse või joogivette enne loomadele andmist. Vedelat uuritavat kemikaali võib manustada vahetult või lahjendada enne manustamist.

▼M7

Sissehingamise kaudu toimuva kokkupuute korral manustatakse uuritavat kemikaali gaasi, auru või tahke/vedela dispersse faasiga aerosoolina, sõltuvalt kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Kasutada tuleks uuritava kemikaali värskeid preparaate, välja arvatud juhul, kui püsivuse andmetest nähtub, et säilitamine on aktsepteeritav ja on määratletud asjakohased säilitamistingimused.

Lahusti/vehiikul

Kasutatavates annustes ei tohi lahusti/vehiikul avaldada toksilist toimet ega keemiliselt reageerida uuritava kemikaaliga. Kui kasutatakse muid kui kirjeldatud omadustega lahusteid/vehiikuleid, peab võrdlusandmetest nähtuma nende sobivus. Kui vähegi võimalik, on kõigepealt soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti/vehiikuli kasutamist. Tavaliselt kasutatavad lahustid/vehiikulid on näiteks vesi, füsioloogiline keedusoolalahus, metüültselluloosi lahus, karboksümetüültselluloosi naatriumsoola lahus, oliiviõli ja maisiõli. Kui puuduvad varasemad või avaldatud kontrolli andmed, millest nähtub, et valitud ebatüüpiline lahusti/vehiikul ei põhjusta kromosoomaberratsioonide teket ega muid kahjulikke tagajärgi, tuleb kõigepealt teha eelkatse, et tõendada lahusti/vehiikuli kontrolliks kasutamise sobivust.

Kontrollid

Positiivsed kontrollid

Igasse katsesse peab tavaliselt kavandama positiivse kontrolli kemikaaliga kokku puutuva loomade rühma. Sellest võib loobuda juhul, kui katselabor on tõendanud kõnealuse katse läbiviimise pädevust ja on kindlaks teinud varasemate katsete positiivse kontrolli vahemiku. Kui paralleelset positiivse kontrolli rühma ei kasutata, tuleb igas katses teha hindamise kontrolle (fikseeritud ja värvimata mikropreparaadid). Neid saadakse, kui katse hindamisel lisatakse asjakohased võrdlusstandardid, mis on saadud ja säilitatud eraldi tehtud positiivse kontrolli katsest, mida tehakse uuringukatset läbiviivas laboris korrapäraselt (nt iga 6–18 kuu tagant), näiteks tasemekatsete käigus ja seejärel korrapäraselt vastavalt vajadusele.

Positiivse kontrolli kemikaalid peavad usaldusväärselt põhjustama struktuursete kromosoomaberratsioonidega rakkude esinemissageduse määratava suurenemise, võrreldes spontaanse esinemissagedusega. Positiivse kontrolli annused valitakse nii, et nende toime on selge, kuid see ei paljasta hindajale kohe kodeeritud proovide identiteeti. Positiivse kontrolli kemikaali manustamiseks võib kasutada ka muud manustamisteed kui uuritava kemikaali puhul, muu manustamisskeemi kasutamine ja proovide võtmine võib toimuda ka ainult ühel ajahetkel. Kui see on asjakohane, võib lisaks kaaluda selliste positiivse kontrolli kemikaalide kasutamist, mis kuuluvad uuritava kemikaaliga samasse kemikaalide rühma. Tabelis 1 on esitatud mõned positiivse kontrolli kemikaalide näited.

Tabel 1

Positiivse kontrolli kemikaalide näited

Kemikaal	CASi nr
Etüülmetaansulfonaat	62-50-0
Metüülmetaansulfonaat	66-27-3
N-etüül-*N*-nitrosokarbamiid	759-73-9
Mitomütsiin C	50-07-7
Tsüklofosfamiid (monohüdraat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietüleenmelamiin	51-18-3

▼M7

Negatiivsed kontrollid

Igal proovivõtukorral tuleb võtta proovid ka negatiivse kontrolli rühma loomadelt, keda muidu tuleb käidelda samamoodi nagu katserühma loomi, selle erinevusega, et neile ei manustata uuritavat kemikaali. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse lahustit/vehiikulit, tuleb kontrollrühmale manustada sedasama lahustit/vehiikulit. Kui igal proovivõtu korral on saadud negatiivse kontrolli andmed kromosoomaberratsioonidega rakkude esinemissageduse kohta olnud kooskõlas katselabori varasemates katsetes saadud negatiivse kontrolli andmetega, arvestades loomadevahelist varieeruvust, võib negatiivse kontrolli jaoks vaja minna ainult ühte proovivõttu. Kui negatiivse kontrolli puhul kasutatakse ainult ühte proovivõttu, tuleb see teha uuringu esimese proovivõtu ajal.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

Üldjuhul on mikrotuumade tekke reaktsioon isas- ja emasloomadel ühesugune (9) ning eeldatakse, et see kehtib ka kromosoomaberratsioonide kohta; seepärast võib enamiku katseid teha ükskõik kummast soost loomadega. Andmed, millest nähtuks isas- ja emasloomade vaheline erinevus (nt süsteemse toksilisuse, metabolismi, biosaadavuse, luuüdi suhtes avalduva toksilisuse jne erinevus, sealhulgas nt annusevahemiku uuringu sellekohased andmed), toetaksid kummastki soost loomade kasutamist. Sel juhul võib olla asjakohane teha uuring kummastki soost loomadega, näiteks osana korduvannuse toksilisuse uuringust. Kui kasutatakse kummastki soost loomi, võib olla asjakohane kasutada mitme faktori määramist võimaldavat katseplaani. Üksikasjad, kuidas sellise katseplaani puhul andmeid analüüsida, on esitatud 2. liites.

Uuringu alguses tuleb määrata rühmade suurused, nii et rühmas oleks vähemalt viis analüüsitavat samast või kummastki soost looma (kui kasutatakse mõlemast soost loomi). Kui inimese kokkupuude kemikaalidega võib olla soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse vastavast soost loomadega. Kahe proovivõtuajaga luuüdiuuringuks, milles on kolm eri annusega katserühma, paralleelne negatiivse kontrolli rühm ning positiivse kontrolli rühm (igas rühmas on viis samasoolist looma), on vastavalt maksimaalsele tüüpvajadusele vaja 45 looma.

Annused

Kui tehakse annusevahemiku eeluuring, sest puuduvad sobivad andmed annusevahemiku valimiseks, tuleb see teha samas laboris ning kasutada sama loomaliiki, -liini, sugu ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuuringus (10). Uuringu eesmärk on kindlaks määrata maksimaalne talutav doos (*maximum tolerated dose*, MTD), mis on suurim annus, mida loomad uuringuperioodil taluvad, ilma et neil avalduks uuringut piirava toksilisuse nähte (näiteks väheneb neil kehamass või avaldub tsütotoksilisus vereloomesüsteemi suhtes, kuid see ei kutsu esile surmajuhte ega sellist valu, piinlemist või kannatusi, mis nõuaksid loomade humaanset hukkamist (11)).

Suurimat annust võib määratleda ka doosina, mille korral esineb teatavaid luuüdi suhtes avalduva toksilisusega seotud nähte.

Kemikaalid, mille toksiko-kineetilistes omadustes esineb küllastumine või mis põhjustavad selliseid detoksifitseerimisprotsesse, mille tõttu kokkupuude võib väheneda pärast nende pikaajalist manustamist, võivad olla doosi määramise kriteeriumide seisukohast erandlikud ning iga üksikjuhtumit tuleks hinnata eraldi.

Teabe saamiseks annuse ja toime seose kohta peab täielikus uuringus olema negatiivne kontrollrühm ja vähemalt kolm eri annust, mis tavaliselt erinevad üksteisest kaks korda, kuid mitte enam kui neli korda. Kui kemikaal ei ole doosivahemiku eelkatse või olemasolevate andmete põhjal toksiline, on suurim ühekordselt manustatav annus 2 000 mg kehamassi kg kohta. Kui uuritav kemikaal siiski on toksiline, peab suurim manustatav annus olema maksimaalne talutav doos (MTD) ning muud kasutatavad annused peaksid eelistatavalt olema vahemikus sellest maksimaalselt talutavast doosist kuni vähetoksilise või

▼M7

üldse mitte toksilise annuseni. Kui toksilisust sihtkoe (luuüdi) suhtes täheldatakse kõigi katses kasutatud annuste puhul, on soovitatav teha katse ka mittetoksilise annusega. Uuringutes, milles tahetakse täielikult iseloomustada kvantitatiivset annuse ja toime seost, võib vaja minna täiendavaid annuserühmi. Teatavat tüüpi uuritavate kemikaalide (näiteks inimravimite) puhul, millele kohaldatakse erinõudeid, võivad need piirmäärad olla teistsugused.

Piirsisalduskatse

Kui annusevahemiku leidmise katsetest või lähedasi loomaliine käsitlevatest andmetest on saadud tõendeid, et piirannuse manustamise katses (kirjeldatud allpool) ei ole uuritaval kemikaalil sedastatavat toksilist toimet (sealhulgas luuüdirakkude paljunemise vähenemist ega muid tõendeid tsütotoksilisusest sihtkoes), ja kui genotoksilisust ei ole alust eeldada *in vitro* genotoksilisuse uuringute või sarnase struktuuriga kemikaalide andmete põhjal, võib täielikku kolme annusetasemega uuringut käsitada ebavajalikuna, kui on tõendatud, et uuritav kemikaal jõuab / uuritavad kemikaalid jõuavad sihtkoeni (luuüdisse). Sellistel juhtudel võib olla piisav teha katse ühe annusega, mis on piirannus. Kui manustamisperiood on rohkem kui 14 päeva, on piirannus 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Kui manustamisperiood on 14 päeva või vähem, on piirannus 2 000 mg kehamassi kg kohta päevas.

Annuste manustamine

Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese võimalikku kokkupuuteviisi. Seega võib valida selliste kokkupuuteviiside seast, nagu manustamine sööda või joogiveega, paikselt naha alla, veenisiseselt, suu kaudu (toitmissondiga), inhalatsiooniga, intratrahheaalselt või implantatsiooniga, kui see on põhjendatud. Igal juhul tuleb kokkupuuteviisi valikuga tagada kemikaali adekvaatne kokkupuude sihtkoega/-kudedega. Tavaliselt ei soovitata intraperitoneaalset süstimist, sest see ei ole inimese puhul ette nähtud kokkupuuteviis, ning seda võib kasutada ainult konkreetse teadusliku põhjenduse alusel. Kui uuritav kemikaal segatakse sööda sisse või joogivette, eriti ühekordse annuse manustamise korral, tuleb jälgida, et ajavahemik sööda ja vee tarbimise ning proovide võtmise vahel oleks piisav, et võimaldada toime tuvastamist (vt punktid 33–34). Vedeliku suurim kogus, mida saab toitmissondi kaudu või süstimisel ühe korraga manustada, sõltub katselooma suurusest. Tavaliselt ei tohi kogus ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kus võib kasutada kogust 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema koguse kasutamise korral tuleb seda põhjendada. Kui jätta välja ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille toime on suurema kontsentratsiooni korral tavaliselt tugevam, tuleb katses vedelikukoguse varieeruvust minimeerida ja reguleerida kontsentratsioone nii, et kõiki annuseid manustataks kehamassi suhtes ühesuguse lahusekogusega.

Manustamiskava

Tavaliselt manustatakse uuritavaid kemikaale ühekordse annusena, kuid neid võib manustada ka jagatud annustena (näiteks kaks manustamist ühel päeval mitte rohkem kui 2–3tunnise vahega), et kergendada suure lahusekoguse manustamist. Selles olukorras või kui uuritavat kemikaali manustatakse inhalatsiooniga, tuleb proovide võtmise aeg kavandada viimase manustamise või kokkupuute lõppemise aja põhjal.

Korduvannuse eeskirja kasutamise kohta seoses käesoleva katsega on vähe andmeid. Olukorras, kui on siiski soovitatav ühendada see katse korduvannuse toksilisuse katsega, tuleb jälgida, et välditaks kromosoomikahjustustega mitoosirakkude kadu, mis võib tekkida toksiliste annuste juures. Selline katsete ühendamine on vastuvõetav ainult siis, kui suurim annus on suurem piirannusest (vt

▼M7

punkt 29) või sellega võrdne ja annuserühmale manustatakse piirannust kogu töötlemise perioodi ajal. Mikrotuumade tekke katset (katsemeetod B.12) tuleb käsitada valikmeetodina kromosoomaberratsioonkatseks *in vivo*, kui seda soovitakse ühendada teiste uuringutega.

Luuüdiproovid tuleb võtta kahel korral pärast ühekordset manustamist. Näriliste puhul peab esimene proovivõtuvahemik võrduma ajaliselt 1,5 normaalse rakutsükli läbimiseks kuluva ajaga (tavaliselt 12–18 tundi pärast manustamist). Kuna uuritava kemikaali / uuritavate kemikaalide omastamiseks ja metabolismiks vajalik aeg ja ka kemikaali toime rakutsükli kineetikale võivad mõjutada optimaalset aega kromosoomaberratsioonide tuvastamiseks, on soovitatav võtta teine proov 24 tundi pärast esimese proovi võtmist. Esimese proovivõtu ajal peab uuritav kemikaal olema manustatud kõigile annuserühmadele ning kõigilt rühmadelt kogutakse proovid analüüsimiseks; järgmistel proovivõtukordadel tuleb manustada üksnes suurimat annust. Kui teadusliku põhjenduse alusel kasutatakse üle ühe päeva pikkust annustusskeemi, kasutatakse pärast lõppannuse manustamist ligikaudu 1,5 normaalse rakutsükli kestuse möödumise järel tavaliselt ühte proovivõtu korda.

Pärast manustamist ja enne proovi võtmist süstitakse loomadele intraperitoneaalselt asjakohases annuses rakke metafaasis peatavat ainet (nt koltsemiidi või kolhitsiini) ning proovid võetakse pärast asjakohase ajavahemiku möödumist. Hiirte puhul on see ajavahemik ligikaudu 3–5 tundi enne proovi võtmist ja rottide puhul 2–5 tundi. Luuüdi rakud kogutakse, töödeldakse nende pundumiseks, fikseeritakse ja värvitakse ning neis analüüsitakse kromosoomaberratsioonid (12).

Vaatlus

Vähemalt üks kord päevas, eelistatult igal päeval samal ajal ning võttes arvesse ajavahemikku, kui eeldatav toime avaldub pärast annuse manustamist kõige intensiivsemalt, tuleb teha katseloomade üldine kliiniline vaatlus ja registreerida kõik kliinilised sümptomid. Haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks tuleb kemikaali manustamise perioodil kõik loomad vähemalt kaks korda päevas üle vaadata. Kõik loomad tuleb kaaluda uuringu alguses, korduvannuse uuringute ajal vähemalt kord nädalas ja pärast eutanaasiat. Kui uuring kestab vähemalt ühe nädala, tuleb vähemalt kord nädalas mõõta tarbitud sööda kogust. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist mõõta pärast iga veevahetust ja vähemalt üks kord nädalas. Loomad, kellel avalduvad äärmusliku, kuigi mitte letaalse toksilisuse rasked nähud, tuleb enne katse lõppu humaanselt hukata (11).

Sihtkoe kokkupuude

Kui muid andmeid uuritava kemikaali ja luuüdi kokkupuute tõendamiseks ei ole, tuleb asjakohasel ajal (asjakohastel aegadel) võtta vereproov(id) ja analüüsida neist kemikaali sisaldust plasmas, et selle kaudu tõendada luuüdi ja kemikaali kokkupuute toimumist (vt punkt 44).

Luuüdi- ja kromosoomipreparaadid

Kohe pärast humaanset eutanaasiat eraldatakse luuüdi rakud loomade reie- või sääreluust, pannakse hüpotoonilisse lahusesse ja fikseeritakse. Seejärel tehakse metafaasis olevatest rakkudest äigepreparaat ning värvitakse see kindlaks määratud meetoditel (vt 3, 12).

▼M7

Analüüs

Kõik mikroskoobipreparaadid, sh positiivse ja negatiivse kontrolliga, tuleb enne analüüsi sõltumatult kodeerida ja randomiseerida, nii et hindaja ei teaks, millise rühma loomalt proov on saadud.

Kõikide katseloomade (sh positiivse kontrolli loomade) ning kemikaaliga mitte kokku puutunud või vehiikuli/lahustiga kokku puutunud negatiivse kontrolli rühma loomade puhul tuleb tsütotoksilisuse mõõtmiseks määrata mitoosiindeks, kasutades vähemalt 1 000 rakku iga looma kohta.

Iga looma kohta tuleb analüüsida 200 metafaasis rakku struktuursete kromosoomaberratsioonide (nii koos tühikutega kui ka ilma tühikuid arvestamata) esinemise suhtes (6). Kui varasemate katsete negatiivse kontrolli andmebaasi alusel nähtub, et struktuursete kromosoomaberratsioonide keskmine esinemissagedus katselaboris on < 1 %, tuleb kaaluda täiendavate rakkude hindamist. Kromatiid- ja kromosoomaberratsioonid tuleb eraldi registreerida ja klassifitseerida alatüüpide alusel (murrud, vahetused). Labori eeskirjad peavad tagama, et kromosoomaberratsioonianalüüsi teevad pädevad hindajad ning vajaduse korral kasutatakse vastastikust hindamist. Arvestades, et mikroskoobipreparaadi valmistamise meetodid põhjustavad sageli osa metafaasis olevate rakkude purunemise, mille tõttu kaotatakse kromosoome, peab hinnatavates rakkudes tsentromeeride arv olema mitte väiksem kui $2n \pm 2$, kus n on liigiomane haploidne kromosoomiarv.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

Iga looma andmed esitatakse tabelina. Iga looma kohta tuleb esitada mitoosiindeks, hinnatud metafaasirakkude arv, kromosoomaberratsioonide arv metafaasis raku kohta ja kromosoomaberratsioonidega rakkude osakaal (protsent). Eri tüüpi struktuursed kromosoomaberratsioonid tuleb esitada koos nende esinemise absoluutarvu ja sagedusega katse- ja kontrollirühmades. Tühikud, nagu ka polüploidsed rakud ja endoreduplitseeritud kromosoomid registreeritakse eraldi. Tühikute sagedus esitatakse, kuid üldjuhul ei arvestada seda struktuursete aberratsioonide üldsageduse analüüsis. Kui reaktsiooni puhul puudub tõendus sugudevahelise erinevuse kohta, võib andmed statistilise analüüsi jaoks ühendada. Samuti tuleb esitada andmed loomadel avaldunud toksilisuse kohta ja kliinilised sümptomid.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid on järgmised:

a) paralleelse negatiivse kontrolli tulemused on vastuvõetavad, et lisada need labori varasemate tulemuste andmebaasi (vt punktid 11–14);

b) paralleelsed positiivsed kontrollid või hindamise kontrollid peavad tekitama reaktsioone, mis on võrreldavad nendega, mis on saadud varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaasist, ning positiivse kontrolli kemikaal peab põhjustama statistiliselt olulise suurenemise negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punktid 20–21);

c) analüüsitud on asjakohane arv annuseid ja rakke;

d) suurima annuse valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mida on kirjeldatud punktides 25–28.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt positiivsena, kui:

▼M7

a) vähemalt ühes annuserühmas esineb struktuursete kromosoomaberratsioonidega (välja arvatud tühikud) rakkude esinemissageduse statistiliselt oluline suurenemine paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;

b) see suurenemine on vähemalt ühel proovivõtu ajal annusest sõltuv, kui seda hinnatakse asjakohase trenditestiga, ning

c) ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli katsete jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %).

Kui teataval proovivõtu ajal uuritakse üksnes suurimat annust, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt positiivsena, kui võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga tuvastatakse statistiliselt oluline suurenemine ja tulemused on väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli andmete jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %). Soovitusi asjakohaste statistiliste meetodite kohta leiab kirjandusest (13). Annuse-reaktsiooni analüüsi korral tuleb analüüsida vähemalt kolme annuse katserühma. Statistiliste testide puhul tuleb ühte looma lugeda katseühikuks. Kromosoomaberratsioonikatses saadud positiivsed tulemused tähendavad, et uuritav kemikaal põhjustab kromosoomaberratsioone katses kasutatud loomaliigi luuüdis.

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt negatiivsena, kui kõikides uuritud katsetingimustes:

a) mitte üheski annuserühmas ei esine struktuursete kromosoomaberratsioonidega (välja arvatud tühikud) rakkude esinemissageduse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;

b) ühelgi proovivõtu ajal ei esine annusest sõltuvat suurenemist, kui seda hinnatakse asjakohase trenditestiga;

c) kõik tulemused on labori varasemate katsete negatiivse kontrolli jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %), ning

d) luuüdi kokkupuude uuritava kemikaaliga on toimunud.

Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta leiab kirjandusest (13). Uuritava kemikaali luuüdiga kokkupuute tõendus võib olla mitoosiindeksi vähenemine või uuritava kemikaali / uuritavate kemikaalide kontsentratsiooni mõõtmine plasmas või täisveres. Intravenoosse manustamise puhul ei ole kokkupuudet vaja tõendada. Teise võimalusena võib luuüdi kokkupuute tõendamiseks kasutada uuritava kemikaali imendumise, jaotumise, metabolismi ja eritumise (ADME) andmeid, mis on saadud sõltumatu uuringuga, milles on kasutatud sama manustamisviisi ja loomaliiki. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et kemikaal ei põhjusta nendel katsetingimustel kromosoomaberratsioone kasutatud loomaliigi luuüdis.

Selget positiivset või selget negatiivset vastust ei ole vaja kinnitada.

Juhul kui vastus ei ole selgelt negatiivne ega positiivne ning selleks, et aidata mõista tulemuse (nt väikse või piiripealse suurenemise) bioloogilist olulisust, tuleb andmetele anda eksperdihinnang ja/või täiendavalt uurida olemasolevaid lõpetatud katseid. Mõnel juhul võib kasulikuks osutatud suurema arvu rakkude analüüsimine või muudetud katsetingimustega korduskatse.

▼M7

Harvadel juhtudel ei võimalda isegi täiendavate uuringute tulemused teha järeldust, kas uuritava kemikaaliga saadud tulemus on positiivne või negatiivne; sel juhul loetakse uuringu tulemus ebaselgeks.

Polüploidsuse ja endoreduplikatsiooniga metafaaside arv tuleb registreerida eraldi metafaaside koguarvust. Polüploidsete/endoreduplikatsiooniga rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritaval kemikaalil on võime inhibeerida mitoosi protsesse või rakutsükli edenemist (vt punkt 3).

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

Kokkuvõte

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumise kuupäev, kui olemas;

— uuritava kemikaali stabiilsus, kui teada.

Ühe koostisosaga aine:

— välimus, lahustuvus vees ja täiendavad asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite nimetused vastavalt vajadusele ja praktilisele teostatavusele jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, komplekssed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:

— iseloomustatakse nii palju kui võimalik, lähtudes koostisosade keemilistest identifitseerimisandmetest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Uuritava kemikaali preparaat:

— vehiikuli valiku põhjendus;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/vehiikulis, kui teada;

— sööda, joogivee või sissehingamise kaudu manustamiseks sobiva preparaadi valmistamine;

— preparaadi analüüsi andmed (nt stabiilsus, homogeensus, nominaalsed kontsentratsioonid), kui neid on määratud.

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin ja selle kasutamise põhjendus;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

— meetod loomade üheseks identifitseerimiseks;

— lühiajaliste uuringute puhul: iga looma kehamass katse alguses ja lõpus; ühest nädalast pikemate uuringute puhul: iga looma kehamass uuringu vältel ja sööda tarbimine. Iga rühma kohta tuleb esitada kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve.

▼**M7**

Katsetingimused:

— positiivsed ja negatiivsed (vehiikul/lahusti) kontrollid;

— annusevahemiku määramise katse tulemused, kui tehtud;

— annuse valimise põhjendus;

— uuritava kemikaali preparaadi valmistamise üksikasjad;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— manustamisviisi põhjendus ja manustamise kestus;

— meetodid, millega kontrolliti, et uuritav kemikaal jõudis (uuritavad kemikaalid jõudsid) üldvereringesse või luuüdini;

— tegelik doos (mg kehamassi kg kohta päevas), mis arvutatakse sööda/joogivee tarbimise ja selles oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) järgi, kui asjakohane;

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— eutanaasiameetod;

— analgeesiameetod (kui kasutati);

— manustamis- ja proovivõtukavade üksikasjalik kirjeldus ja nende valiku põhjendus;

— mikroskoobipreparaadi valmistamise meetodid;

— toksilisuse mõõtmise meetodid;

— rakutsüklit metafaasis peatava kemikaali identifitseerimisandmed, kontsentratsioon, annus ja manustamise aeg enne proovivõttu;

— proovide eraldamise ja säilitamise kord;

— aberratsioonide hindamise kriteeriumid;

— looma kohta analüüsitud metafaasis rakkude arv ja mitoosiindeksi määramiseks analüüsitud rakkude arv;

— katse nõuetekohasuse kriteeriumid;

— kriteeriumid, mille alusel uuringud klassifitseeritakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks.

Tulemused:

— loomade seisund enne katset ja kogu katse ajal, sealhulgas toksilisuse sümptomid;

— mitoosiindeks iga looma kohta;

— aberratsioonide tüüp ning arv ja aberratsioonidega rakkude arv iga looma kohta;

— aberratsioonide üldarv rühma kohta ning keskväärtused ja standardhälbed;

— aberratsioonidega rakkude arv rühma kohta ning keskväärtused ja standardhälbed;

— tuvastatud ploidsuse muutused, kaasa arvatud polüploidsete ja/või endoreduplikatsiooniga rakkude esinemissagedus;

▼M7

— annuse-reaktsiooni seos, kui võimalik;

— kohaldatud statistilised analüüsid ja meetodid;

— andmed, mis kinnitavad luuüdi kokkupuudet uuritava kemikaaliga;

— paralleelsed negatiivse ja positiivse kontrolli andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;

— varasemad negatiivse ja positiivse kontrolli andmed, sh vahemik, keskväärtused, standardhälbed ja jaotuse usaldusvahemik usaldatavustasemel 95 %, samuti hõlmatud ajavahemik ja vaatluste arv;

— positiivsuse või negatiivsuse täidetud kriteeriumid.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

Viited.

KIRJANDUS

(1) OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals“, väljaandes *Mutagenicity Testing*: *A Practical Approach*, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275–306.

(3) Preston, R.J. *et al*. (1987), „Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells“, *Mutation Research*, Vol. 189/2, pp. 157–165.

(4) Richold, M. jt (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, väljaandes *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*, *UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report. Part I revised*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115–141.

(5) Tice, R.R. *et al*. (1994), „Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test“, *Mutation Research*, Vol. 312/3, pp. 305–312.

(6) Adler, I.D. *et al*. (1998), „Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 417/1, pp. 19–30.

(7) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al*. (2011), „Compilation and use of genetic toxicity historical control data“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87–90.

(9) Hayashi, M. *et al*. (1994), „*In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293–304.

(10) Fielder, R.J. *et al*. (1992), „Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays“, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313–319.

▼**M7**

(11) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment*, N°19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), „Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse“, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1044, pp. 147–163.

(13) Lovell, D.P. *et al*. (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays“, väljaandes *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184–232.

▼**M7**

1. liide

MÕISTED

Aneuploidsus – iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve kromosoomistiku / tervete kromosoomistike võrra (polüploidsus).

Endoreduplikatsioon – protsess, milles pärast DNA replikatsiooni S-perioodi ei käivitu rakutuumas mitoos, vaid algab uus S-periood. Selle tulemusena tekivad kromosoomid, milles on 4, 8, 16,..., kromatiidi.

Genoommutatsioon – kasutatud rakkude normaalse kromosoomiarvu muutus (aneuploidsus).

Kemikaal – aine või segu.

Kromatiidaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub üksikkromatiidide katkemisena või kromatiidide katkemise ja nendevahelise taasühinemisena.

Kromosoomaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub mõlema kromatiidi katkemise või katkemise ja taasühinemisena samas kohas.

Mitoosiindeks – rakupopulatsiooni mitoosis olevate rakkude arvu ja rakkude koguarvu suhe; selle näitaja järgi hinnatakse vaadeldava rakupopulatsiooni paljunemist.

Polüploidsus – kromosoomiarvu muutus, mille puhul erinevalt kromosoomistiku üksikkromosoomide arvu muutusest (aneuploidsus) muutub kromosoomiarv terve kromosoomistiku / tervete kromosoomistike võrra.

Struktuurne aberratsioon – raku jagunemise metafaasi etapis mikroskoopiliselt tuvastatav kromosoomi struktuuri muutus, mida nähakse deletsioonide ja fragmentidena, inversioonide või kromosoomivaheliste translokatsioonidena.

Tsentromeer – kromosoomi ala(d), mille külge kinnituvad kääviniidid raku jagunemise ajal ja võimaldavad tütarkromosoomide korrapärast liikumist tütarrakkude poolustele.

Tühik – akromaatiline kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja mille puhul kromatiidi lineaarse struktuuri muutusega kaasnev nihe on minimaalne.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M7

2. liide

MITME FAKTORI MÄÄRAMIST VÕIMALDAV KATSEPLAAN SUGUDEVAHELISTE ERINEVUSTE KINDLAKSTEGEMISEKS *IN VIVO* KROMOSOOMABERRATSIOONIKATSES

Mitme faktori määramist võimaldav katseplaan ja selle analüüs

Selle katseplaani korral tehakse katse vähemalt viie isas- ja viie emasloomaga igal kontsentratsioonitasemel, milleks on vaja vähemalt 40 looma (20 isas- ja 20 emaslooma, lisaks veel asjakohased positiivse kontrolli katsed).

Sellise katseplaani analüüs, mis on üks lihtsamaid mitme teguri määramise analüüse, on samaväärne kahefaktorilise dispersioonanalüüsiga, milles peamised tegurid on sugu ja kontsentratsiooni väärtus. Andmete analüüsimiseks võib kasutada mitmeid statistikatarkvara standardpakette, nagu SPSS, SAS, STATA, Genstat, samuti võib kasutada R-keskkonda.

Analüüsiga jagatakse andmete dispersioon osadeks: sooga seotud, kontsentratsiooniga seotud ning soo ja kontsentratsiooni interaktsiooniga seotud dispersiooniks. Igaühte nendest komponentidest võrreldakse dispersiooni hinnanguga, mis iseloomustab sama katserühma loomade (samast soost loomad ja sama kontsentratsiooni väärtus) kohta saadud tulemusi. Aluseks oleva metoodika üksikasjalik kirjeldus on esitatud standardsetes statistikaõpikutes (vt viited) ja statistikapakettide *help*-funktsiooni juhendites.

Edasi analüüsitakse kahe faktori (sugu × kontsentratsioon) interaktsiooni ANOVA tabelis ([1]). Olulise interaktsiooniliikme puudumise korral tagavad eri sugude või eri kontsentratsioonide koondväärtused valiidsed statistilised testid ANOVA rühmasisese dispersiooni liikmel põhinevate väärtuste vahel.

Edasiseks analüüsiks jaotatakse kontsentratsioonidevahelise dispersiooni hinnang kontrastideks, millega saab kontrollida reaktsioonide lineaarseid kontraste ja ruutkontraste kõikidel kontsentratsioonitasemetel. Kui esineb muutujate (sugu × kontsentratsiooni) oluline interaktsioon, saab ka selle liikme jaotada interaktsiooni kontrastideks (lineaarne kontrast × sugu ja ruutkontrast × sugu). Need muutujad võimaldavad teha kindlaks, kas eri sugude puhul on reaktsioonid kemikaalile võrreldavad või erinev.

Rühmasisese dispersiooni hinnangut võib kasutada keskväärtuste erinevuste paariviisilisel võrdlemisel. Neid võrdlusi võib teha kahe soo keskväärtuste vahel ja eri kontsentratsioonivääruste keskväärtuste vahel, näiteks võrrelda neid negatiivse kontrolli väärtustega. Juhul, kui esineb oluline interaktsioon, võib võrrelda samast soost loomade puhul eri kontsentratsioonidega saadud tulemuste keskväärtusi või eri sugudest loomade puhul sama kontsentratsiooniga saadud tulemuste keskväärtusi.

Viited

Paljudes statistikaõpikutes käsitletakse lihtsast kahe faktori analüüsist kuni katsemetoodika mudelite keerukamate vormideni ulatuvat mitmefaktoriliste mudelite teooriat, katseplaane, metoodikat, analüüsi ja tõlgendamist. Järgmiseks on esitatud mittetäielik loetelu. Mõnes raamatus esitatakse võrreldavate mudelite praktilisi näiteid, mõnel juhul koos koodiga, mis võimaldab analüüsida tulemusi mitmesuguste tarkvarapakettide abil.

([1]) Statistikud, kes kasutavad modelleerimist, näiteks üldisi lineaarseid mudeleid (General Linear Models, GLM), võivad analüüsiks kasutada erinevat, ent võrreldavat lähenemisviisi, kuid ei pruugi tingimata tuletada tavalist ANOVA tabelit, mis põhineb arvutieelse ajastu statistiliste näitajate arvutamiseks kasutatud algoritmidel.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. ja Hunter, J.S. (1978), *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building.* New York, John Wiley & Sons.

Box G.E.P. and Draper, N.R. (1987), *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. and Davey, A.J.H. (2007), *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences.* Cambridge University Press.

Mead, R. (1990), *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application.* Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997), *Design and Analysis of Experiments.* John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971), *Statistical Principles in Experimental Design.* McGraw Hill.

Wu, C.F.J ja Hamada, M.S. (2009), *Experiments: Planning, Analysis and Optimization.* John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. **MIKROTUUMADE TEKKE KATSE IMETAJATE ERÜTROTSÜÜTIDEGA**

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 474 (2014). See kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

Mikrotuumade tekke *in vivo* katse imetajarakkudega on genotoksilisuse hindamiseks eriti oluline, sest kuigi *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA reparatsiooni protsessid võivad erineda liigiti, on need aktiivsed ja annavad oma panuse reaktsioonidesse. *In vivo* katse on kasulik ka täiendavateks uuringuteks, kui genotoksilisus on tuvastatud *in vitro* süsteemiga.

Mikrotuumade tekke *in vivo* katset imetajarakkudega kasutatakse, et teha kindlaks erütroblastide kromosoomide või mitoosiaparaadi kahjustus, mille on põhjustanud uuritav kemikaal. Katsega hinnatakse mikrotuumade moodustumist erütrotsüütides, mis saadakse loomadelt, tavaliselt närilistelt, võetud luuüdi või perifeerse vere rakkude proovidest.

Mikrotuumade tekke katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis põhjustavad tsütogeneetilist kahjustust, mille tulemus on kas kromosoomiloivest mahajäänud fragmente või terveid kromosoome sisaldava mikrotuumade moodustumine.

Kui luuüdi erütroblast areneb ebaküpseks erütrotsüüdiks (mõnikord nimetatakse seda ka polükroomseks erütrotsüüdiks või retikulotsüüdiks), siis põhituum lükatakse välja; moodustunud mikrotuumad võivad jääda tsütoplasmasse. Põhituuma puudumine hõlbustab mikrotuumade visualiseerimist või määramist nendes rakkudes. Mikrotuumsete ebaküpsete erütrotsüütide esinemissageduse suurenemine kemikaaliga kokkupuutunud loomades näitab, et kemikaal on tekitanud struktuurseid kromosoomaberratsioone või kromosoomiarvu muutusi.

Uudismoodustisena tekkinud mikrotuumadega erütrotsüüte määratakse ja loendatakse värvimise abil, millele järgneb kas visuaalne hindamine mikroskoobiga või automaatanalüüs. Piisava arvu ebaküpsete erütrotsüütide loendamist täiskasvanud loomade perifeerses veres või luuüdis hõlbustab oluliselt automaatse hindamisplatvormi kasutamine. Sellised platvormid on vastuvõetav alternatiiv käsitsi hindamisele (2). Võrdlevate uuringutega on näidatud, et selliste meetoditega, milles kasutatakse asjakohaseid kaliibrimisstandardeid, saab tagada parema laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ja tundlikkuse kui mikroskoobi abil käsitsi hindamisega (3, 4). Automatiseeritud süsteemid, millega saab mõõta mikrotuumadega erütrotsüütide sagedust, on läbivoolutsütomeetrid (5), kujutiste analüüsi platvormid (6, 7) ja laserskaneerimisega tsütomeetrid (8), kuid neid on veel muidki.

Kuigi seda kõnealuse katse raames tavaliselt ei tehta, saab kromosoomifragmente eristada terviklikest kromosoomidest rea kriteeriumide alusel. Need hõlmavad kinetohoori või tsentromeerse DNA olemasolu või puudumise kindlakstegemist; mõlemad on iseloomulikud terviklikele kromosoomidele. Kinetohoori või tsentromeerse DNA puudumine näitab, et mikrotuum sisaldab üksnes kromosoomifragmente; kui need on olemas, näitab see kromosoomide kaotsiminekut.

Kasutatud terminite määratlused on esitatud 1. liites.

▼M7

LÄHTEKAALUTLUSED

Selle katse puhul on geneetilise kahjustuse sihtkoeks noorte täiskasvanud näriliste luuüdi, kuna erütrotsüüdid tekivad selles koes. Mikrotuumade määramiseks perifeerse vere ebaküpsetes erütrotsüütides võib kasutada ka muid imetajaliike, kui nende puhul on tõendatud piisav tundlikkus, mis võimaldab kindlaks teha kemikaale, mis põhjustavad struktuurseid kromosoomaberratsioone või kromosoomiarvu muutusi nendes rakkudes (tekitades mikrotuumasid ebaküpsetes erütrotsüütides), ja esitatakse teaduslik põhjendus. Mikrotuumadega ebaküpsete erütrotsüütide sagedus on peamine uuritav näitaja. Uuritava näitajana võib kasutada ka mikrotuumi sisaldavate perifeerse vere küpsete erütrotsüütide sagedust liigis, mille põrnas ei esine tugevat selektsiooni mikrotuumadega erütrotsüütide vastu ja kui loomadel on pidev kokkupuude kemikaaliga ajavahemiku jooksul, mis on pikem kui erütrotsüüdi eluiga asjaomases liigis (hiirte puhul näiteks neli nädalat või rohkem).

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav(ad) kemikaal(id) või metaboliit(metaboliidid) ei jõua sihtkoeni, ei pruugi käesoleva katse kasutamine olla asjakohane.

Enne kui meetodit hakatakse kasutama segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi saavutamiseks, tuleb kaaluda, kas sel viisil üldse saadakse sobivaid tulemusi selle eesmärgi jaoks, ja kui, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Loomadele manustatakse uuritavat kemikaali sobiva manustamistee kaudu. Luuüdi kasutamise korral hukatakse loomad humaanselt sobival ajal pärast kemikaali manustamist; eraldatakse luuüdi, valmistatakse preparaadid ning värvitakse need (9–15). Kui kasutatakse perifeerset verd, võetakse veri sobival ajal pärast manustamist, valmistatakse preparaadid ja värvitakse need (12, 16–18). Kui kemikaal manustatakse lühikese aja jooksul, on oluline valida luuüdi või perifeerse vere proovide võtmiseks selline aeg, kus kemikaali toimel tekkinud mikrotuumsete ebaküpsete erütrotsüütide määramine on võimalik. Proovide võtmisel perifeersest verest peab olema möödunud piisavalt aega, et sellised ebaküpsed erütrotsüüdid oleksid jõudnud vereringesse. Preparaate analüüsitakse mikrotuumade esinemise määramiseks kas mikroskopeerides, läbivoolutsütomeetriaga või laserskaneeriva tsütomeetriaga.

LABORI PÄDEVUSE KONTROLLIMINE

Pädevuse tõendamise katsed

Enne katsete rutiinset tegemist peab labor tõendama, et tal on piisavalt kogemusi selle katse tegemiseks; selleks peab ta näitama, et suudab korrata mikrotuumade sageduse määramise kohta avaldatud töödes (17, 19–22) saadud tulemusi vähemalt kahe positiivse kontrolli kemikaaliga (kaasa arvatud positiivse kontrolli kemikaalide väikeste doosidega saadud nõrk toime), vt tabel 1, ja vastava vehiikuli/lahusti kontrolli katsega (vt punkt 26). Nendes katsetes tuleks kasutada doose, mis annavad reprodutseeritavaid ja doosist sõltuvaid suurenemisi ning tõendavad labori kasutatava hindamismeetodi puhul katsesüsteemi tundlikkust ja dünaamilist ulatust huvipakkuvas koes (luuüdi või perifeerne veri). Seda nõuet ei kohaldata kogemusega laborite puhul, see tähendab, kui on olemas varasemate katsete andmebaas, mis on määratletud punktides 14–18.

Varasemad kontrolli andmed

Pädevuse tõendamise katsete käigus peab labor kindlaks tegema:

— varasemate positiivse kontrolli katsete väärtuste vahemiku ja jaotuse ning

▼M7

— varasemate negatiivse kontrolli katsete väärtuste vahemiku ja jaotuse.

Kui hakatakse saama tulemusi varasemate negatiivse kontrolli andmete jaotuse kohta, peaksid negatiivse kontrolli paralleelide väärtused olema kooskõlas kontrolli katsete avaldatud andmetega (kus need on avaldatud). Kui varasemate kontrolli katsete jaotusele lisatakse uusi eksperimendiandmeid, peaksid paralleelsete negatiivse kontrolli katsete tulemused ideaaljuhul olema selle jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %. Labori varasemate negatiivse kontrolli katsete andmebaas peaks olema statistiliselt usaldusväärne, et laboril oleks võimalik hinnata oma negatiivse kontrolli andmete jaotust. Kirjanduse põhjal läheb vaja vähemalt kümmet katset, kuid parem oleks, kui andmebaasis oleksid vähemalt 20 võrreldavates tingimustes tehtud katse tulemused. Laboritel tuleb kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, selliseid nagu kontrollkaardid (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (23)), et määrata, kui suures ulatuses nende andmed varieeruvad, ja tõendada, et metoodika on laboris „kontrolli all“. Täiendavaid soovitusi selle kohta, kuidas koguda ja kasutada varasemaid andmeid (st varasemate andmete andmebaasi võtmise või sellest väljajätmise kriteeriumid ja konkreetse katse vastuvõetavuse kriteeriumid), võib leida kirjandusest (24).

Kui labor ei tee piisavat arvu katseid, et saada statistiliselt usaldusväärne negatiivse kontrolli jaotus (vt punkt 15) pädevuskontrolli katsete käigus (kirjeldatud punktis 13), siis on lubatud selle jaotuse kindlakstegemine esimeste rutiinsete katsetega. Sellise lähenemisviisi kasutamisel tuleks järgida kirjanduses (24) esitatud soovitusi ja negatiivse kontrolli katsetes saadud tulemused peaksid olema kooskõlas avaldatud negatiivse kontrolli andmetega.

Katse-eeskirja igasuguse muutmise puhul tuleks arvestada, kuidas see võib mõjutada saadavate andmete kooskõla labori varasemate kontrolli katsete tulemuste andmebaasiga. Ainult suurte vastuolude tekkimise puhul tuleks koostada uus varasemate kontrolli katsete tulemuste andmebaas, kui ekspertteadmiste alusel tehakse kindlaks, et uus jaotus erineb varasemast jaotusest (vt punkt 15). Uue andmebaasi koostamise ajal ei ole ühe konkreetse katse tegemiseks täielikku negatiivsete kontrolli katsete tulemuste andmebaasi vaja siis, kui labor suudab tõendada, et nende negatiivse kontrolli paralleelkatsete väärtused on kooskõlas kas nende varasema andmebaasiga või vastavate avaldatud andmetega.

Negatiivse kontrolli andmed peaksid sisaldama mikrotuumsete ebaküpsete erütrotsüütide esinemise sagedust iga looma puhul. Negatiivse kontrolli paralleelide tulemused peaksid ideaaljuhul olema labori varasemate kontrolli katsete jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %. Kui negatiivse kontrolli paralleelkatsete tulemused jäävad väljapoole usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %, võivad need olla varasemate kontrolli katsete jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmusliku võõrväärtusega ning on tõendatud, et katsesüsteem on „kontrolli all“ (vt punkt 15), ja ei ole tõendeid, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksitusega.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistus

Loomaliigi valimine

Kasutada tuleks tavapärastest laboriliinidest pärit terveid noori loomi. Kasutada võib hiiri, rotte või muid sobivaid imetajaliike. Kui kasutatakse perifeerset verd, tuleb kindlaks teha, et valitud loomaliigi puhul ei takista mikrotuumsete rakkude

▼M7

vereringest eemaldamine põrna poolt tekkinud mikrotuumsete rakkude kindlakstegemist. See on kindlalt tõendatud roti ja hiire perifeerse vere puhul (2). Katseprotokollis tuleb esitada teaduslik põhjendus, miks kasutati muud liiki kui rott või hiir. Kui kasutatakse muud loomaliiki kui närilisi, on soovitatav, et kemikaali põhjustatud mikrotuumade mõõtmine oleks integreeritud muusse sobivasse toksilisuskatsesse.

Loomade pidamis- ja söötmistingimused

Näriliste puhul peaks pidamisruumi temperatuur olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks ideaaljuhul olema 50–60 %, peaks see olema vähemalt 40 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal. Kasutatakse tehisvalgustust, valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali sobiv lisamine söödasse, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Närilisi tuleb pidada väikestes rühmades (kuni viis looma puuris), igas puuris on samast soost ja sama katserühma loomad, kui ei eeldata agressiivset käitumist; eelistatavalt peaksid puurid olema kõva põrandaga, sobivalt mitmekesistatud keskkonnaga. Loomi võib üksikult pidada ainult siis, kui see on teaduslikult põhjendatud.

Loomade ettevalmistamine

Tavaliselt kasutatakse terveid noori täiskasvanud loomi (näriliste puhul ideaaljuhul soovitatavalt 6–10nädalased, kuigi lubatud on ka veidi vanemad loomad), kes jagatakse juhuvaliku alusel kontrolli- ja katserühmadesse. Iga loom saab kordumatu identimismärgistuse, mille tegemiseks kasutatakse humaanset võimalikult vähe invasiivset meetodit (nt rõngastamine, märgistamine, mikrokiipimine või biomeetriline tuvastamine, kuid mitte kõrva sälkamine või varba köndistamine) ning loomadel lastakse vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõju on võimalikult väike. Positiivse kontrolli ja uuritava kemikaali omavahelist ristsaastumist tuleks vältida. Katse alguses peavad loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte erinema üle ± 20 % kummagi soo keskmisest massist.

Dooside valmistamine

Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või vehiikulis või segada sööda sisse või joogivette enne loomadele andmist. Vedelat uuritavat kemikaali võib manustada vahetult või lahjendada enne manustamist. Sissehingamise kaudu toimuva kokkupuute korral manustatakse uuritavat kemikaali gaasi, auru või tahke/vedela disperse faasiga aerosoolina, sõltuvalt kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Kasutada tuleks uuritava kemikaali värskeid valmistisi, välja arvatud juhul, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav ja on määratletud sobivad säilitamistingimused.

Katsetingimused

Lahusti/vehiikul

Lahusti/vehiikul avaldada toksilist toimet korral kasutatavate dooside korral ega keemiliselt reageerida uuritava kemikaaliga. Kui kasutatakse tuntud lahustist/vehiikulist erinevat lahustit või ainet, peab olema võrdlusandmetega näidatud, et see on sobiv. Kui vähegi võimalik, on kõigepealt soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti/vehiikuli kasutamist. Tavaliselt kasutatavad lahustid/kandeained on näiteks vesi, füsioloogiline keedusoolalahus, metüültselluloosi lahus, karboksümetüültselluloosi naatriumsoola lahus, oliiviõli ja maisiõli. Kui ei ole varasemaid või kirjanduses avaldatud kontrolli andmeid, mis näitaksid, et valitud ebatüüpiline lahusti/vehiikul ei põhjusta mikrotuumade moodustumist ega muid kahjulikke tagajärgi, tuleks kõigepealt teha esialgne katse, et näidata lahusti/vehiikuli sobivust lahusti/vehiikuli kontrolli katses.

▼M7

Kontrollid

Positiivsed kontrollid

Igasse katsesse peab tavaliselt lisama positiivse kontrolli kemikaaliga kokku puutuva loomade rühma. Sellest võib loobuda juhul, kui katselabor on tõendanud kõnealuse katse läbiviimise pädevust ja on kindlaks teinud varasemate katsete positiivse kontrolli väärtuste vahemiku. Kui paralleelset positiivse kontrolli rühma ei kasutata, tuleb igas katses teha hindamise kontrolli katseid (fikseeritud ja värvimata mikroskoobipreparaadid või rakususpensioonide proovid, sõltuvalt sellest, mis on hindamismeetodi asjakohane). Neid võib saada sobivate võrdlusstandardite hindamise lisamisega uuringu hindamistesse; selliseid võrdlusstandardeid saadakse eraldi positiivse kontrolli katsega, mida tehakse korrapäraselt (nt iga 6–18 kuu tagant) ja millega saadud materjale selleks alles hoitakse; näiteks kasutatakse tasemekatsete materjale ja seejärel tehakse selleks katseid korrapäraselt vastavalt vajadusele.

Positiivse kontrolli kemikaalid peavad usaldusväärselt põhjustama mikrotuumade sageduse määratava suurenemise, võrreldes mikrotuumade spontaanse esinemissagedusega. Mikroskoobiga hindamise korral tuleks positiivse kontrolli doosid valida nii, et nende toime oleks selge, kuid hindaja ei tohiks kodeeritud preparaatide hulgas kontrolli katset siiski kohe ära tunda. Positiivse kontrolli kemikaali manustamiseks on lubatud kasutada ka muud manustamisteed kui uuritava kemikaali puhul, muu manustamisskeemi kasutamine ja proovide võtmine võib toimuda ka ainult ühel ajahetkel. Võimaluse korral tuleks kaaluda selliste positiivse kontrolli kemikaalide kasutamist, mis kuuluvad samasse kemikaalide rühma kui uuritav kemikaal. Tabelis 1 on esitatud mõned positiivse kontrolli kemikaalide näited.

Tabel 1

Positiivse kontrolli kemikaalide näited.

Kemikaal ja CASi nr
Etüülmetaansulfonaat [CASi nr 62-50-0]
Metüülmetaansulfonaat [CASi nr 66-27-3]
Etüülnitrosokarbamiid [CASi nr 759-73-9]
Mitomütsiin C [CASi nr 50-07-7]
Tsüklofosfamiid (monohüdraat) [CASi nr 50-18-0 (CASi nr 6055-19-2)]
Trietüleenmelamiin [CASi nr 51-18-3]
Kolhitsiin [CASi nr 64-86-8] või vinblastiin [CASi nr 865-21-4] kui aneugeenid

Negatiivsed kontrollid

Igal proovivõtukorral tuleks võtta proovid ka negatiivse kontrolli rühma loomadelt, keda muidu tuleks käidelda kui katserühma kuuluvaid loomi, selle erinevusega, et neile ei manustata uuritavat kemikaali. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse lahustit/vehiikulit, tuleb kontrollrühmale manustada sedasama lahustit/vehiikulit. Kui igal proovivõtu korral on loomadevahelise varieeruvuse ja mikrotuumadega rakkude esinemissagedus andmed siiski olnud tõendatult kooskõlas katselabori varasemates katsetes saadud negatiivse kontrolli andmetega, võib negatiivse kontrolli jaoks vaja minna ainult ühte proovivõttu. Kui negatiivse kontrolli puhul kasutatakse ainult ühte proovivõttu, peab see toimuma katse esimese proovivõtu ajal.

▼M7

Kui kasutatakse perifeerset verd, võib lühiajalise uuringu korral enne kemikaali manustamist võetud proovi kasutada paralleelse negatiivse kontrollina, kui saadud tulemused on kooskõlas sama labori varasemate kontrollikatsete tulemuste andmebaasiga. Rottide puhul on näidatud, et väikese ruumalaga proovide (nt alla 100 µl päevas) võtmisel on minimaalne mõju mikrotuumade taustsagedusele (25).

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

Üldiselt on mikrotuumade tekke reaktsioon isas- ja emasloomadel sarnane ja seepärast võib enamiku uuringuid teha ükskõik kummast soost loomadega (26). Andmed, millest nähtuks isas- ja emasloomade vaheline erinevus (nt süsteemse toksilisuse, metabolismi, biosaadavuse, luuüdi suhtes avalduva toksilisuse jne erinevus, sealhulgas nt annusevahemiku uuringu andmed), toetaksid kummastki soost loomade kasutamist. Sellisel juhul võib olla asjakohane teha uuring kummastki soost loomadega, näiteks osana korduvdoosi toksilisuse uuringust. Kui kasutatakse mõlemast soost loomi, võib olla asjakohane kasutada mitme faktori määramist võimaldavat katseplaani. Üksikasjad selle kohta, kuidas sellise katseplaani puhul andmeid analüüsida, on esitatud 2. liites.

Uuringu alguses tuleks moodustada nii suured rühmad, et igas rühmas oleks viis analüüsitavat looma ühest soost või kummastki soost, kui kasutatakse mõlemast soost loomi. Kui inimese kokkupuude kemikaalidega võib olla soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse vastavast soost loomadega. Luuüdi uuringuks, mis viiakse läbi punktis 37 sätestatud näitajate määramiseks kolme doosirühma ning paralleelsete negatiivse ja positiivse kontrolli rühmadega (millest igaühesse kuuluvad viis samast soost looma), kulub loomadega seotud kõige tüüpilisemate nõuete kohaselt 25–35 looma.

Doosid

Kui tehakse vahemiku leidmise eeluuring, sest sobivaid andmeid doosi valimiseks ei ole, tuleb see teha samas laboris, kasutades sama loomaliiki, -liini, sugu ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuuringus (27). Uuringu eesmärk on kindlaks määrata maksimaalne talutav doos (*maximum tolerated dose*, MTD), mis on suurim doos, mida loomad suudavad taluda uuringu ajavahemiku jooksul ilma, et neil avalduks uuringut piirava toksilisuse nähte (näiteks väheneb neil kehamass või avaldub tsütotoksiline mõju vereloomesüsteemi suhtes, kuid see ei kutsu veel esile surma ega selliseid valu, piinlemist või kannatusi, mis nõuaksid loomade humaanset hukkamist (28)).

Suurima doosi võib samuti määratleda kui doosi, mis avaldab toksilist toimet luuüdile (näiteks vähendab ebaküpsete erütrotsüütide osakaalu luuüdis või perifeerses veres rohkem kui 50 % erütrotsüütide üldarvust, kuid mitte väiksema väärtuseni kui 20 % kontrolli väärtusest). Kui analüüsitakse CD71-positiivseidrakke perifeerses vereringes (läbivoolutsütomeetria abil), reageerib see väga noorte ebaküpsete erütrotsüütide fraktsioon toksilise kemikaaliga mõjutamisele siiski kiiremini kui ebaküpsete erütrotsüütide RNA-positiivne suurem fraktsioon. Seetõttu võib akuutset kokkupuudet hõlmava katsekorralduse korral avalduda suurem näiline toksilisus, kui mõõdetakse CD71-positiivsete ebaküpsete erütrotsüütide fraktsiooni, võrreldes sellise katsekorraldusega, kus ebaküpseid erütrotsüüte määratakse RNA-sisalduse järgi. Kui katses kasutatakse sellist kokkupuudet kemikaaliga, mis kestab viis päeva või vähem, võib toksilise toimega uuritavate kemikaalide suurima doosi määratleda kui doosi, mis põhjustab CD71-positiivsete ebaküpsete erütrotsüütide osakaalu statistiliselt olulise vähenemise erütrotsüütide üldarvus, kuid mitte väiksema väärtuseni kui 5 % kontrolli väärtusest (29).

▼M7

Kemikaalid, mille toksiko-kineetilistes omadustes esineb küllastumine, või mis põhjustavad selliseid detoksifitseerimisprotsesse, mille tõttu kokkupuude võib väheneda pärast pikaajalist manustamist, võivad olla doosi määramise kriteeriumide seisukohast erandlikud ning neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi.

Selleks et saada teavet doosi ja toime seose kohta, peaks täielik uuring hõlmama negatiivse kontrolli rühma ja vähemalt kolme doositaset, mis tavaliselt erinevad üksteisest kaks korda, kuid mitte rohkem kui neli korda. Kui doosivahemiku leidmise uuringus või olemasolevate andmete põhjal ei põhjusta uuritav kemikaal toksilisust, tuleks 14-päevase või pikema manustamisperioodi puhul kasutada suurimat doosi 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas, 14 päevast lühema manustamisperioodi puhul aga 2 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Kui uuritava kemikaali puhul avaldub toksiline toime, peaks suurim manustatav doos olema MTD ning muud kasutatavad doositasemed peaksid eelistatult hõlmama vahemikku MTD-st kuni vähese toksilisusega või ilma toksilise toimeta doosini. Kui toksilisust sihtkoe (luuüdi) suhtes täheldatakse kõikide katses kasutatud dooside korral, on soovitatav teha katse ka mittetoksilise doosiga. Uuringute puhul, millega tahetakse täielikult iseloomustada kvantitatiivset doosi-toime sõltuvust, võib vaja minna täiendavaid doosirühmasid. Teatavat tüüpi uuritavate kemikaalide (näiteks inimtervishoius kasutatavate ravimite) puhul, millele kohaldatakse erinõudeid, võivad need piirmäärad olla teistsugused.

Piirsisalduskatse

Kui doosipiirkonna leidmise katsetega või lähedasi loomaliine käsitlevatest andmetest on saadud tõendeid, et piirdoosi manustamise katses (kirjeldatud allpool) ei ole uuritaval kemikaalil sedastatavat toksilist toimet (sealhulgas luuüdirakkude paljunemise vähenemist ega muid tõendeid sihtkoe suhtes avalduva tsütotoksilisuse suhtes), ja kui genotoksilisust ei ole alust eeldada *in vitro* genotoksilisuse uuringute või sarnase struktuuriga kemikaalide andmete põhjal, võib täielikku kolme doositasemega uuringut pidada ebavajalikuks, kui on tõendatud, et uuritav kemikaal jõuab (uuritavad kemikaalid jõuavad) sihtkoesse (luuüdisse). Sellistel juhtudel võib olla piisav ühe doosiga nn piirsisalduskatse. Kui manustamine kestab 14 päeva või rohkem, on piirdoos 1 000 mg kehakaalu kg kohta päevas. Kui manustamisperiood on vähem kui 14 päeva, on piirdoos 2 000 mg kehakaalu kg kohta päevas.

Dooside manustamine

Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese võimalikku kokkupuuteviisi. Seepärast võib vastavalt põhjendatusele kasutada selliseid manustamisviise nagu manustamine söödaga, joogiveega, paikselt naha alla, veenisiseselt, suu kaudu (toitmissondiga), inhalatsiooniga, intratrahheaalselt või implantatsiooniga. Igal juhul tuleb manustamistee valikuga tagada kemikaali adekvaatne kokkupuude sihtkoega (-kudedega). Tavaliselt ei soovitata intraperitoneaalset süstimist, kuna see ei ole inimese puhul ette nähtud kokkupuute viis, ning seda tuleks kasutada ainult konkreetse teadusliku põhjendatuse korral. Kui uuritav kemikaal segatakse sööda sisse või joogivette, eriti üheainsa doosi manustamise korral, tuleks jälgida, et sööda ja vee tarbimise ning proovide võtmise vahel oleks ajavahemik, mis oleks piisav, et võimaldada toime tuvastamist (vt punkt 37). Vedeliku suurim kogus, mida saab toitmissondi kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Tavaliselt ei tohiks kogus ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kus võib kasutada kogust 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema koguse kasutamise korral tuleb seda põhjendada. Kui jätta kõrvale ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille toime on suurema kontsentratsiooni korral tavaliselt tugevam, tuleks katses vedeliku ruumala varieeruvust minimeerida ja reguleerida kontsentratsioone nii, et kõiki doose manustataks kehamassi suhtes ühesuguse lahusekogusega.

▼M7

Manustamiskava

Eelistatavalt tuleks kemikaali manustada kaks või rohkem korda, 24-tunniste vahedega, eriti kui katse ühendatakse muude toksilisuse uuringutega. Alternatiivina võib kemikaali manustada ühe korraga, kui see on teaduslikult põhjendatud (nt kui uuritav kemikaal teadaolevalt blokeerib rakutsükli). Uuritavaid kemikaale võib manustada ka jagatud doosina, näiteks kaks manustamist ühel päeval mitte rohkem kui 2–3-tunnise vahega, et hõlbustada lahuse suure ruumala manustamist. Sellistel asjaoludel, või kui uuritavat kemikaali manustatakse sissehingamisega, tuleks proovide võtmise aeg kavandada selle põhjal, millal toimus viimane manustamine või lõpetati kokkupuude.

Katse võib teha hiirte või rottidega ühel viisil järgmistest kolmest:

a. Loomi mõjutatakse uuritava kemikaaliga ühel korral. Luuüdi proovid võetakse vähemalt kahel korral (sõltumatutest loomarühmadest), alustades mitte varem kui 24 tundi pärast manustamist, kuid mitte hiljem kui 48 tundi pärast manustamist, ning jäetakse sobivad ajavahemikud proovide vahele, kui ei ole teada, et uuritava kemikaali poolestusaeg on erakordselt pikk. Proovide võtmist varem kui 24 tundi pärast manustamist tuleb põhjendada. Perifeerse vere proovid võetakse vähemalt kahel korral (ühest ja samast loomarühmast), alustades mitte varem kui 36 tundi pärast manustamist ning jättes esimese proovivõtu järele sobiva(d) ajavahemiku(d); viimane proov võetakse mitte hiljem kui 72 tundi pärast manustamist. Esimese proovivõtu ajal tuleb kõigile doosirühmadele manustada uuritav kemikaal ja kõigilt kogutakse proovid analüüsimiseks; järgmistel proovivõtukordadel tuleb manustada üksnes suurimat doosi. Kui positiivne tulemus on tuvastatud ühel proovivõtukorral, siis lisaproove ei ole vaja võtta, kui ei vajata kvantitatiivset teavet doosi-toime seosest. Kirjeldatud proovivõtuajad tulenevad mikrotuumade ilmumise ja kadumise kineetikast nendes kahes koekompartmendis.

b. Kui kasutatakse kahte või enamat manustamist sagedusega üks kord päevas (nt kaks manustamist 24-tunnise intervalliga), võetakse luuüdi proovid üks kord 18–24 tundi pärast viimast manustamist ja perifeerse vere proovid üks kord 36–48 tundi pärast viimast manustamist (30). Kirjeldatud proovivõtuajad tulenevad mikrotuumade ilmumise ja kadumise kineetikast nendes kahes koekompartmendis.

c. Kui kasutatakse kolme või enamat manustamist sagedusega üks kord päevas (nt kolm või enam manustamist ligikaudu 24 tunni järel), tuleb luuüdi proovid võtta hiljemalt 24 tundi pärast viimast manustamist ja perifeerse vere proovid tuleb võtta hiljemalt 40 tundi pärast viimast manustamist (31). Selline manustamisviis võimaldab kombineerida nn komeedikatse (nt proovide võtmine 2–6 tundi pärast viimast manustamist) ja mikrotuumade tekke katse ning siduda mikrotuumade tekke katse korduvdoosi toksilisuse uuringutega. Kogutud andmed on näidanud, et mikrotuumade tekke indutseerimist võib jälgida nende pikemate ajavahemike jooksul, kui kemikaali on manustatud kolm või enam korda (15).

Võib kasutada ka muid dooside manustamise ja proovide võtmise ajakavasid, kui need on asjakohased ja teaduslikult põhjendatud ning hõlbustavad katsete ühendamist muude toksilisuse määramise katsetega.

Vaatlus

Vähemalt üks kord päevas, eelistatult igal päeval samal ajal ning võttes arvesse ajavahemikku, kui eeldatav toime avaldub pärast manustamist kõige intensiivsemalt, tuleb teha katseloomade üldisi kliiniline vaatlus ja registreerida kõik kliinilised sümptomid. Haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks tuleb kemikaali manustamise perioodil kõik loomad vähemalt kaks korda päevas üle vaadata. Kõik loomad tuleb kaaluda uuringu alguses, vähemalt kord nädalas korduvdoosi uuringute ajal ja pärast eutanaasiat. Kui uuring kestab vähemalt ühe nädala, tuleb

▼M7

vähemalt kord nädalas mõõta sööda tarbimist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist mõõta pärast iga veevahetust ja vähemalt üks kord nädalas. Loomad, kellel avalduvad surmavaga mitte lõppeva raske toksilisuse nähud, tuleb humaanselt hukata enne katse lõppu (28). Teatavate asjaolude puhul võiks jälgida loomade kehatemperatuuri, kuna kemikaali manustamisest tingitud hüper- või hüpotermiat on seostatud ekslike tulemuste põhjustamisega (32–34).

Sihtkoe kokkupuude

Sobival ajal (sobivatel aegadel) tuleb võtta vereproov, et mõõta uuritava kemikaali sisaldust vereplasmas, selleks et tõendada, et luuüdi kokkupuude on tõesti toimunud, kui muid andmeid kokkupuute kohta ei ole olemas (vt punkt 48).

Luuüdi-/verepreparaat

Luuüdirakud eraldatakse tavaliselt loomade reie- või sääreluudest vahetult pärast humaanset eutanaasiat. Rakud eraldatakse, prepareeritakse ja värvitakse enamasti kindlakskujunenud meetoditega. Loomade heaolu standarditega kooskõlas võib perifeerse vere väikse ruumalaga proove võtta, kas meetodiga, mis võimaldab katselooma ellu jätta, näiteks vere võtmine sabaveenist või muust sobivast veresoonest, või südamepunktsiooniga või proovi võtmisega suurest veresoonest looma eutanaasia ajal. Luuüdist või perifeersest verest saadud erütrotsüütide puhul võib, olenevalt analüüsimeetodist, rakud kohe värvida supravitaalvärvide abil (16–18), teha äigepreparaadid ja seejärel värvida mikroskoopia jaoks või fikseerida ja värvida rakud sobivalt läbivoolutsütomeetria analüüsi jaoks. DNA-spetsiifilise värvaine kasutamisega (nt akridiinoranž (35) või Hoechst 33258 pluss püroniin-Y (36)) võib vältida mõne muu kui DNA-spetsiifilise värvaine kasutamisega seotud artefakte. See eelis ei välista aga tavaliste värvainete kasutamist (nt Giemsa mikroskoopiliseks analüüsiks). Täiendavaid süsteeme (nt tsellulooskolonne tuumaga rakkude eemaldamiseks (37, 38)) saab samuti kasutada tingimusel, et laboris on tõendatud kõnealuste süsteemide ühildatavus preparaatide valmistamisega.

Kui kõnealused meetodid on kohaldatavad, võib kinetohoorivastaseid antikehi (39), *in situ* fluorestsentshübriidimist pantsentromeersete DNA proovidega (40) või praimerite põhist *in situ* märgistamist pantsentromeersete praimeritega koos DNA asjakohase kontrastvärvimisega (41) kasutada, et määrata, mida mikrotuumad sisaldavad (kromosoom/kromosoomifragment), et teha kindlaks, kas mikrotuumade tekke põhjus on klastogeenne või aneugeenne protsess. Klastogeenide ja aneugeenide eristamiseks võib kasutada muid meetodeid, mille kohta on tõendatud, et need on tõhusad.

Analüüs (manuaalne ja automaatne)

Kõik analüüsitavad mikroskoobipreparaadid või proovid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollide omad, kodeeritakse sõltumatult enne analüüsi ja need tuleb randomiseerida, et käsitsi hindaja ei teaks, millise kokkupuutetasemega on proovi puhul tegemist; selline kodeerimine ei ole vajalik, kui kasutatakse automaatsüsteeme, mis ei põhine visuaalsel vaatlusel ja mida hindaja kallutatus ei saa mõjutada. Iga looma kohta määratakse ebaküpsete erütrotsüütide osakaal erütrotsüütide koguhulgast (ebaküpsed + küpsed), loendades kokku vähemalt 500 erütrotsüüti luuüdist ja 2 000 erütrotsüüti perifeersest verest (42). Ebaküpsete mikrotuumsete erütrotsüütide esinemissageduse määramiseks hinnatakse looma kohta vähemalt 4 000 ebaküpset erütrotsüüti (43). Kui varasemad negatiivse kontrolli andmed andmebaasis näitavad, et mikrotuumsete erütrotsüütide esinemise keskmine taustsagedus asjaomases laboris on < 0,1 %, tuleks kaaluda täiendavate rakkude hindamist. Proovide analüüsimisel ei tohiks ebaküpsete erütrotsüütide osakaal erütrotsüütide üldarvust olla väiksem kui 20 % vastavast osakaalust

▼M7

lahusti/vehiikuli kontrolli katsetes mikroskoobi abil hindamise puhul ja mitte väiksem kui ligikaudu 5 % vastavast osakaalust lahusti/vehiikuli kontrolli katsetes, kui näitajat CD 71+ ebaküpsed erütrotsüüdid hinnatakse tsütomeetriliste meetoditega (vt punkt 31) (29). Näiteks kui luuüdi katset hinnatakse mikroskoobi abil ja kui kontrolli katses on ebaküpsete erütrotsüütide osakaal luuüdis 50 %, oleks toksilisuse ülempiir 10 % ebaküpseid erütrotsüüte.

Kuna roti põrn peab kinni ja hävitab mikrotuumseid erütrotsüüte, oleks analüüsi suure tundlikkuse säilitamiseks roti perifeerse vere analüüsimise puhul soovitatav piirduda mikrotuumsete ebaküpsete erütrotsüütide kõige noorema fraktsiooni analüüsimisega. Automatiseeritud analüüsimeetodite kasutamise korral võib neid kõige ebaküpsemaid erütrotsüüte teha kindlaks nende suure RNA-sisalduse järgi või nende pinnal ekspresseeritud transferriiniretseptorite (CD71+) suure arvu järgi (31). Erinevate värvimismeetodite otsene võrdlus on siiski näidanud, et häid tulemusi on võimalik saada mitmesuguste meetoditega, sealhulgas tavapärase akridiinoranžiga värvimise abil (3, 4).

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

Andmed üksikute loomade kohta esitatakse tabelina. Iga analüüsitava looma kohta tuleb eraldi esitada ebaküpsete erütrotsüütide arv, mikrotuumadega ebaküpsete erütrotsüütide arv ja ebaküpsete erütrotsüütide osakaal erütrotsüütide üldarvust. Kui uuritavat kemikaali manustatakse hiirtele järjest neli nädalat või rohkem, tuleb esitada andmed ka mikrotuumsete küpsete erütrotsüütide arvu ja osakaalu kohta, kui neid on kogutud. Samuti tuleb esitada andmed toksilisuse kohta ja kliinilised sümptomid.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid on järgmised:

a. paralleelse negatiivse kontrolli tulemused loetakse sobivaks selleks, et need lisada labori varasemate tulemuste andmebaasi (vt punktid 15–18);

b. paralleelse positiivse kontrolli tulemused või hindamise kontrolli tulemused peaksid näitama toimet, mis on võrreldav varem laboris saadud positiivse kontrolli tulemustega, ning põhjustama statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolli tulemustega (vt punktid 24–25);

c. analüüsitud peab olema vajalik arv doose ja rakkusid;

d. suurima doosi valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mida on kirjeldatud punktides 30–33.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui:

a. vähemalt ühes doosirühmas esineb ebaküpsete mikrotuumsete erütrotsüütide esinemissageduse statistiliselt oluline suurenemine, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga;

b. see suurenemine sõltub doosist vähemalt ühel proovide võtmise ajal, kui seda hinnatakse sobiva trenditestiga, ning

c. ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli katsete jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %).

▼M7

Kui teataval proovivõtuajal uuritakse üksnes suurimat doosi, loetakse konkreetne uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui tuvastatakse statistiliselt oluline suurenemine, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga, ja tulemused on väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli andmete jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %). Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta võib leida kirjandusest (44–47). Doosi-toime analüüsi tegemise korral tuleks analüüsida vähemalt kolme doosirühma. Statistiliste testide puhul tuleb ühte looma lugeda katseühikuks. Mikrotuumade tekke katse positiivsed tulemused viitavad sellele, et uuritav kemikaal indutseerib mikrotuumade teket; mikrotuumad tekivad katsealuse loomaliigi erütroblastide kromosoomide või mitoosiaparaadi kahjustuse tagajärjel. Kui tehakse katse, et kindlaks teha tsentromeeride olemasolu mikrotuumades, on uuritav kemikaal, mis tekitab tsentromeeri sisaldavaid mikrotuumasid (tsentromeerne DNA või kinetohoor, mis viitab terve kromosoomi kaotusele), tõendiks, et uuritav kemikaal on aneugeen.

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui kõikides uuritud katsetingimustes:

a. mitte üheski doosirühmas ei esine ebaküpsete mikrotuumsete erütrotsüütide esinemissageduse statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga;

b. doosist sõltuvat suurenemist ei esine ühelgi proovivõtuajal, kui selle hindamiseks kasutatakse sobivat trenditesti;

c. kõik need tulemused on labori varasemate negatiivse kontrolli katsete jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %), ning

d. toimus luuüdi kokkupuude uuritava kemikaaliga.

Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta võib leida kirjandusest (44–47). Tõend luuüdi kokkupuutest uuritava kemikaaliga võib olla ebaküpsete ja küpsete erütrotsüütide proportsiooni vähenemine või uuritava kemikaali kontsentratsiooni mõõtmine vereplasmas või veres. Intravenoosse manustamise puhul ei ole tõendeid kokkupuute kohta vaja esitada. Teise võimalusena võib luuüdi kokkupuute tõendamiseks kasutada uuritava kemikaali imendumise, jaotumise, metabolismi ja eritumise (ADME) andmeid, mis on saadud sõltumatu uuringuga, milles on kasutatud sama manustamisviisi ja loomaliiki. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et antud katsetingimustes ei põhjusta kemikaal katsealuse loomaliigi ebaküpsetes erütrotsüütides mikrotuumade teket.

Selget positiivset või selget negatiivset vastust ei ole vaja kinnitada.

Juhul kui vastus ei ole negatiivne ega positiivne ning selleks, et aidata mõista tulemuse (nt vähese või piiripealse suurenemise) bioloogilist olulisust, tuleb andmetele anda eksperdihinnang ja/või uurida lõpetatud katsest saadud tulemusi edasi. Mõnel juhul võib olla kasulik analüüsida rohkem rakke või teha korduskatse, kasutades muudetud katsetingimusi.

Harvadel juhtudel ei võimalda isegi edasiste uuringutega saadud andmed teha järeldust, kas uuritava kemikaaliga saadi positiivne või negatiivne tulemus, sel juhul loetakse, et tulemus on ebaselge.

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

Kokkuvõte

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumise kuupäev, kui see on teada;

▼M7

— uuritava kemikaali stabiilsus, kui see on teada.

Ühest koostisosaga aine:

— välimus, lahustuvus vees ja täiendavad asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite keemiline laad vajaduse ja praktilise teostatavuse korral jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:

— iseloomustatakse võimaluste piires keemiliste identifitseerimisandmete (vt eespool), kvantitatiivse sisalduse ja asjakohaste füüsikalis-keemiliste omaduste kaudu.

Uuritava kemikaali preparaadi valmistamine:

— vehiikuli valiku põhjendus;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/vehiikulis, kui on teada;

— sööda, joogivee või sissehingamise kaudu manustamiseks sobiva koostisega preparaadivormi valmistamine;

— osutatud koostiste analüüsid (nt, stabiilsus, homogeensus, nominaalsed kontsentratsioonid), kui neid on tehtud.

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin ja selle kasutamise põhjendus;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

— meetod loomade üheseks identifitseerimiseks;

— lühiajaliste uuringute puhul: iga looma kehamass katse alguses ja lõpus; ühest nädalast kauem kestva uuringu korral: iga looma kehamass uuringu vältel ja toidu tarbimine. Tuleks lisada kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

— positiivse ja negatiivse (lahus/vehiikuli) kontrolli andmed;

— doosivahemiku määramise katse tulemused, kui see katse tehti;

— doositaseme valimise põhjendus;

— uuritava kemikaali preparaadi valmistamise üksikasjad;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— manustamistee ja manustamise kestuse põhjendus;

— meetodid, millega kontrolliti, et uuritav kemikaal jõudis (uuritavad kemikaalid jõudsid) üldvereringesse või sihtkoesse;

▼**M7**

— tegelik doos (mg kehakaalu kg kohta päevas), mis arvutatakse sööda/joogivee tarbimise ja uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) järgi selles, kui see on kohaldatav;

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— eutanaasia meetod;

— analgeesiameetod (kui kasutati);

— manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus ja nende valiku põhjendused;

— mikroskoobipreparaadi valmistamise meetodid;

— proovide eraldamise ja säilitamise kord;

— toksilisuse mõõtmise meetodid;

— ebaküpsete mikrotuumsete erütrotsüütide hindamise kriteeriumid;

— analüüsitud rakkude arv looma kohta mikrotuumsete erütrotsüütide esinemissageduse kindlaksmääramisel ning ebaküpsete ja küpsete erütrotsüütide suhte määramisel;

— katse nõuetekohasuse kriteeriumid;

— vajaduse korral meetodid, millega uuriti, kas mikrotuum sisaldab terveid kromosoome või nende fragmente, näiteks kinetohoorivastaste antikehade või tsentromeerispetsiifiliste DNA-proovide kasutamine.

Katsetulemused:

— loomade seisund enne katset ja kogu katse ajal, sealhulgas toksilisuse avaldumise sümptomid;

— ebaküpsete erütrotsüütide osakaal erütrotsüütide üldarvust;

— ebaküpsete mikrotuumsete erütrotsüütide arv, esitatakse iga looma kohta eraldi;

— mikrotuumsete ebaküpsete erütrotsüütide arvu keskväärtus ± standardhälve rühma kohta;

— doosi ja toime suhe, võimaluse korral;

— kasutatud statistilised analüüsid ja meetodid.

— paralleelsete negatiivse ja positiivse kontrolli katsete andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;

— varasemad negatiivse ja positiivse kontrolli andmed, sh vahemik, keskväärtused, standardhälbed ja jaotuse usaldusvahemik usaldatavustasemel 95 %, samuti hõlmatud ajavahemik ja mõõtepunktide arv;

— andmed, mis kinnitavad luuüdi kokkupuudet uuritava kemikaaliga;

— andmed selle kohta, kas mikrotuumad sisaldavad terveid kromosoome või kromosoomifragmente, kui see on asjakohane;

— positiivset või negatiivset toimet kinnitavad kriteeriumid, mis on täidetud.

▼**M7**

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

Viited.

KIRJANDUS

(1) OECD, OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. *et al*. (2007), „*in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 10–30.

(3) MacGregor, J.T. *et al*. (2006), „Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat“, *Toxicology Sciences*, Vol. 94/1, pp. 92–107.

(4) Dertinger, S.D. *et al*. (2006), „Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring“, *Toxicological Sciences*, Vol. 94/1, pp. 83–91.

(5) Dertinger, S.D. *et al*. (2011), „Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage“, *Mutagenesis*, Vol. 26/1, pp. 139–145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), „Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system“, *Mutation Research*, Vol. 370/1, pp. 65–73.

(7) Asano, N. *et al*. (1998), „An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 404/1-2, pp. 149–154.

(8) Styles, J.A. *et al*. (2001), „Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry“, *Cytometry*, Vol. 44/2, pp. 153–155.

(9) Heddle, J.A. (1973), „A rapid *in vivo* test for chromosomal damage“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 187–190.

(10) Schmid, W. (1975), „The micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 31/1, pp. 9–15.

(11) Heddle, J.A. *et al*. (1983), „The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program“, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, pp. 61–118.

(12) Mavournin, K.H. *et al*. (1990), „The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program“, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, pp. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. *et al*. (1983), „Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice“, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, pp. 555–558.

▼**M7**

(14) MacGregor, J.T. *et al*. (1987), „Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103–112.

(15) MacGregor, J.T. *et al*. (1990), „The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies“, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513–522.

(16) Hayashi, M. *et al*. (1990), „The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245–249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), „Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83–98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), „Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test“. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153–159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), „Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239–273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), „Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45–50.

(21) Hayes, J. *et al*. (2009), „The rat bone marrow micronucleus test-study design and statistical power“, *Mutagenesis,* Vol. 24/5, pp. 419–424.

(22) Wakata, A.*et al*. (1998), „Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS.“ MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84–100.

(23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al*. (2011), „Compilation and use of genetic toxicity historical control data“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87–90.

(25) Rothfuss, A. *et al*. (2011), „Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108–120.

(26) Hayashi, M. *et al*. (1994), „*in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293–304.

(27) Fielder, R.J. *et al*. (1992), „Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays“, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313–319.

▼**M7**

(28) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment*, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), „Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/3, pp. 222–228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), „An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test“, *Mutagenesis*, Vol. 10/4, pp. 313–319.

(31) Hayashi, M. *et al*. (2000), „*in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 234–252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), „High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 390/1-2, pp. 79–83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), „Transient hypothermia induces micronuclei in mice“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 413/1, pp. 7–14.

(34) Spencer, P.J. *et al*. (2007), „Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia“, *Toxicological Sciences*, Vol. 97/1, pp. 120–127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), „An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test“, *Mutation Research Letters*, Vol. 120/4, pp. 241–247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), „A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y“, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269–275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), „The automated bone marrow micronucleus test“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 213/1, pp. 91–104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), „Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure“, *Mutation Research*, Vol. 439/1, pp. 121–126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), „Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*“, *Mutagenesis*, Vol. 5/4, pp. 411–415.

(40) Miller, B.M. *et al*. (1991), „Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA“, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297–302.

(41) Russo, A. (2002), „PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage“, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99–104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), „Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97–99.

(43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment*, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115–141.

(45) Lovell, D.P. *et al*. (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays“, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184–232.

(46) Hayashi, M. *et al*. (1994), „Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay“, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49–52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), „Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 469/2, pp. 233–241.

▼M7

1. liide

MÕISTED

Erütroblast – varajane staadium erütrotsüütide arengus, mis vahetult eelneb ebaküpse erütrotsüüdi staadiumile, milles rakul on veel olemas tuum.

Kemikaal – aine või segu.

Kinetohoor – valguline struktuur, mis moodustub eukarüootse raku tsentromeeril, ühendab mitoosi ja meioosi ajal kromosoomi mitoosikäävi mikrotuubulite polümeeridega ning toimib raku jagunemise ajal, tõmmates õdekromatiidid teineteisest eemale.

Mikrotuumad – rakus põhituumast eraldi ja lisaks sellele esinevad väikesed tuumad, mis on tekkinud mitoosi või meioosi telofaasi ajal mahajäänud kromosoomifragmentidest või tervetest kromosoomidest.

Normokroomne ehk küps erütrotsüüt – täielikult valminud erütrotsüüt, mis on kaotanud jääk-RNA, mis jääb alles pärast tuuma väljatõukamist ja/või mis on kaotanud muud lühiealised rakumarkerid, mis tavaliselt kaovad pärast erütroblasti viimasele jagunemisele järgnenud enukleatsiooni.

Polükroomne ehk ebaküps erütrotsüüt – hiljuti moodustunud erütrotsüüt oma arengu vahepealses staadiumis; selline erütrotsüüt värvub vere klassikalise värvaine, näiteks Wrighti Giemsa nii sinise kui ka punase komponendiga, kuna sellises hiljuti moodustunud rakus on olemas jääk-RNA. Sellised äsja moodustunud rakud on ligikaudu samad mis retikulotsüüdid, mida muudetakse nähtavaks vitaalvärvidega, mis põhjustavad jääk-RNA kämpude teket retiikulumis. Tänapäeval kasutatakse hiljuti moodustunud punaste vereliblede kindlakstegemiseks sageli muid meetodeid, sealhulgas RNA monokroomset värvimist fluorestseeruvate värvainetega või lühiealiste pinnamarkerite nagu CD71 märgistamist fluorestseeruvate antikehadega. Polükroomsed erütrotsüüdid, retikulotsüüdid ja CD71-positiivsed erütrotsüüdid on kõik ebaküpsed erütrotsüüdid, kuigi igaühel on mõnevõrra erinev vanuseline jaotus.

Retikulotsüüt – hiljuti moodustunud erütrotsüüt, mis on värvitud vitaalvärviga, mis põhjustab raku jääk-RNA kämpude koondumist iseloomulikku retiikulumi. Retikulotsüütidel ja polükroomsetel erütrotsüütidel on sarnane rakkude vanuseline jaotus.

Tsentromeer – kromosoomi ala(d), millele kääviniidid kinnituvad raku jagunemise ajal, võimaldades tütarkromosoomide korrapärast liikumist tütarrakkude poolustele.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M7

2. liide

MITME FAKTORI MÄÄRAMIST VÕIMALDAV KATSEPLAAN SUGUDEVAHELISTE ERINEVUSTE KINDLAKSTEGEMISEKS MIKROTUUMADE TEKKE *IN VIVO* KATSES

Mitme faktori määramist võimaldav katseplaan mudel ja selle analüüs

Selle katseplaani korral tehakse katse vähemalt viie isas- ja viie emasloomaga igal kontsentratsioonitasemel, milleks on vaja vähemalt 40 looma (20 isas- ja 20 emaslooma, lisaks veel asjakohased positiivse kontrolli katsed).

See katseplaan, mis on üks lihtsamaid mitme teguri määramise analüüse, on samaväärne kahefaktorilise dispersioonanalüüsiga, milles peamised tegurid on sugu ja kontsentratsiooni väärtus. Andmete analüüsimiseks võib kasutada mitmeid statistikatarkvara standardpakette, nagu SPSS, SAS, STATA, Genstat; samuti võib kasutada R-keskkonda.

Analüüsiga jagatakse andmete dispersioon osadeks: sooga seotud, kontsentratsiooniga seotud ning soo ja kontsentratsiooni interaktsiooniga seotud dispersiooniks. Igaühte nendest liikmetest testitakse võrdluses dispersiooni hinnanguga, mis iseloomustab katses paralleelselt käideldud loomi, kes on samast soost ja kes puutuvad kokku samasuguse kontsentratsiooniga. Aluseks oleva metoodika üksikasjalik kirjeldus on esitatud paljudes standardsetes statistikaõpikutes (vt viited) ja statistikapakettide *help*-funktsiooni juhendites.

Analüüs toimub interaktsiooniliikme (sugu × kontsentratsioon) uurimise kaudu ANOVA tabelis ([1]). Olulise interaktsiooniliikme puudumise korral saab eri sugude või eri kontsentratsioonitasemete ühendatud väärtusi kasutada kontsentratsioonitasemete vaheliste informatiivsete statistiliste testidena, mis põhinevad rühma piires ühendatud ANOVA dispersiooniliikmel.

Edasiseks analüüsiks jaotatakse kontsentratsioonidevahelise dispersiooni hinnang kontrastideks, millega saab kontrollida mõjude lineaarseid kontraste ja ruutkontraste kõikidel kontsentratsioonidel. Kui on olemas märkimisväärne sugu × kontsentratsiooni interaktsiooni liige, saab ka selle liikme jaotada interaktsiooni kontrastideks lineaarse interaktsiooni kontrast × sugu ja ruutinteraktsiooni kontrast × sugu. Need liikmed võimaldavad teha kindlaks, kas kummagi soo reageerimine kemikaalile on paralleelne või on sugude reageerimine kemikaalile erinev.

Rühma piires koondatud dispersiooni hinnangut võib kasutada keskväärtuste erinevuse paariviisilisel võrdlemisel. Selliseid võrdlusi võib teha kahe soo keskväärtuste vahel ja eri kontsentratsioonitasemete keskväärtuste vahel, näiteks võrdlusteks negatiivse kontrolli väärtustega. Juhul, kui esineb oluline interaktsioon, võib võrrelda samasooliste loomade puhul eri kontsentratsioonidega saadud tulemuste keskväärtusi või erisooliste loomade puhul sama kontsentratsiooniga saadud tulemuste keskväärtusi.

Viited

Paljudes statistikaõpikutes käsitletakse lihtsast kahe faktori analüüsist kuni katsemetoodika mudelite keerukamate vormideni ulatuvat mitmefaktoriliste mudelite teooriat, katseplaane, metoodikat, analüüsi ja tõlgendamist. Järgnevalt on esitatud mittetäielik loetelu. Mõnes raamatus esitatakse võrreldavate katseplaanide praktilisi näiteid, mõnel juhul koos üksikasjalike eeskirjadega, kuidas analüüsida tulemusi mitmesuguste tarkvarapakettide abil.

([1]) Statistikud, kes kasutavad modelleerimist, näiteks üldisi lineaarseid mudeleid (General Linear Models, GLM), võivad analüüsiks kasutada erinevat, ent võrreldavat lähenemisviisi, kuid ei pruugi tingimata tuletada tavalist ANOVA tabelit, mis põhineb arvutieelse ajastu statistiliste näitajate arvutamiseks kasutatud algoritmidel.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building.* New York, John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences.* Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application.* Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). *Design and Analysis of Experiments.* John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). *Statistical Principles in Experimental Design.* McGraw Hill.

Wu, C.F.J ja Hamada, M.S. (2009). *Experiments: Planning, Analysis and Optimization.* John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13/14. **MUTAGEENSUS – BAKTERITE PÖÖRDMUTATSIOONKATSE**

1. **MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 471, Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Bakterite pöördmutatsioonkatses kasutatakse aminohappeid vajavaid *Salmonella typhimurium*'i ja *Escherichia coli* tüvesid punktmutatsiooni avastamiseks, millega kaasneb ühe või mitme DNA aluspaari asendus, lisamine või deletsioon (1, 2, 3). Käesoleva bakterite pöördmutatsioonkatse põhimõtteks on avastada mutatsioonid, mis parandavad katsetüvedes olevaid mutatsioone ja taastavad bakterite funktsionaalse võime sünteesida põhilisi aminohappeid. Revertantsed bakterid avastatakse seepärast, et nad on võimelised kasvama, kuigi katsebakteritüves vajalik aminohape puudub.

Punktmutatsioonid põhjustavad inimestel mitmeid geneetilisi haigusi ja on märkimisväärseid tõendeid selle kohta, et punktmutatsioonid onkogeenides ja keharakkude kasvaja supressorgeenides osalevad inimeste ja katseloomade kasvajate moodustumisel. Bakterite pöördmutatsioonkatse on kiire, odav ja suhteliselt kergesti sooritatav. Paljudel katsetüvedel on mitmeid omadusi, mis muudavad nad tundlikumaks mutatsioonide avastamiseks, sh kergesti reageerivad DNA järjestused pöördmutatsiooni saitides, rakkude suurenenud läbitavus suurte molekulide suhtes ja DNA parandamise süsteemide kõrvaldamine või vigadele vastuvõtlike DNA parandamisprotsesside tõhustamine. Katsetüvede spetsiifilisus võib anda vajalikku teavet genotoksiliste ainete põhjustatud mutatsiooni tüüpide kohta. Väga ulatuslik andmebaas eri struktuuride korral saadud tulemuste kohta on kättesaadav bakterite pöördmutatsioonkatsete põhjal ja kindlakskujunenud meetodid on välja töötatud erinevate füüsikalis-keemiliste omadustega keemiliste ainete, sh lenduvate ühendite testimiseks.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Pöördmutatsioonkatse kas *Salmonella typhimurium*'i või *Escherichia coli* puhul avastab mutatsiooni aminohapet (vastavalt histidiinis või trüptofaanis) nõudvas tüves, mille tulemusena tekib väljastpoolt saadud aminohappest sõltumatu tüvi.

Aluspaari asendusmutageenid on ained, mis põhjustavad aluse vahetust DNAs. Pöördmutatsioonkatses võib kõnealune muutus aset leida algupärase mutatsiooni kohas või muus bakterigenoomi saidis.

Raaminihke mutageenid on ained, mis põhjustavad ühe või mitme DNA aluspaari lisamist või deletsiooni, seega muutes RNA lugemisraami.

▼B

1.3. ALGSED KAALUTLUSED

Bakterite pöördmutatsioonkatse kasutab prokarüootseid rakke, mis erinevad imetajate rakkudest sellise tegurite poolest nagu tagasihaare, metabolism, kromosoomi struktuur ja DNA parandamisprotsessid. Tehtud *in vitro* katsed üldjuhul nõuavad eksogeenset metaboolset aktiveerimist. *In vitro* metaboolse aktiveerimise süsteem ei saa tervenisti jäljendada *in vivo* tingimusi imetajatel. Seetõttu ei anna katse otsest teavet aine mutageensuse või kantserogeensuse kohta imetajatel.

Bakterite pöördmutatsioonkatset kasutatakse tavaliselt genotoksilisust ja eriti punktmutatsiooni põhjustava tegevuse algseks skriinimiseks. Ulatuslik andmebaas on näidanud, et mitmetel keemilistel ainetel, mis annavad käesolevas katses positiivseid tulemusi, on mutageenne aktiivsus ka muudes katsetes. On näiteid mutageensetest ainetest, mida ei avastata käesoleva katse abil; nende ebaõnnestumiste põhjusteks on avastatud lõpp-punkti spetsiifiline olemus, metaboolse aktiveerimise erinevused või biosaadavuse erinevused. Teisalt võivad tegurid, mis tõhustavad bakterite pöördmutatsioonikatse tundlikkust, viia mutageense aktiivsuse ülehindamiseni.

Bakterite pöördmutatsioonkatse ei sobi teatud klassidesse kuuluvate keemiliste ainete hindamiseks, nt väga bakteritsiidsed ühendid (nt teatud antibiootikumid) ja need, mida peetakse (või tuntakse) imetajate raku replikatsioonisüsteemi (nt mõnede topoisomeraasi inhibiitorite ja mõnede nukleosiidide analoogide) mõjutajatena. Sellistel juhtudel on imetajate mutatsioonikatsed sobivamad.

Kuigi paljud ühendid, mis annavad positiivseid tulemusi käesolevas katses, on imetajate kantserogeenid, ei ole korrelatsioon täielik. See sõltub keemilisest aineklassist ning esineb kantserogeene, mida käesoleva katse abil ei avastata, kuna nad tegutsevad muude, mittegenotoksiliste mehhanismide või bakterirakkudes puuduvate mehhanismide abil.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Bakterirakkude suspensioonid allutatakse uuritava aine toimele eksogeense metaboolse aktiveerimise olemasolu ja puudumise korral. Vahetu kokkusegamise meetodil segatakse kõnealused suspensioonid külviagariga ja asetatakse vahetult minimaalsesse kasvukeskkonda. Preinkubatsioonimeetodi puhul inkubeeritakse uuritavat ainet sisaldav segu ja segatakse seejärel külviagariga enne minimaalsesse kasvukeskkonda asetamist. Mõlema metoodika puhul pärast kahte või kolme inkubatsioonipäeva loendatakse revertantkolooniad ja võrreldakse nende arvu spontaansete revertantkolooniate arvuga lahusti kontrollplaatidel.

On kirjeldatud mitmeid bakterite pöördmutatsioonkatse sooritamise menetlusi. Nende seas on enimkasutatavad vahetu kokkusegamise meetod (1, 2, 3, 4), preinkubatsioonimeetod (2, 3, 5, 6, 7, 8), fluktuatsioonimeetod (9, 10) ja suspensioonimeetod (11). Gaaside või aurude uurimist käsitlevaid muudatusi on kirjeldatud (12).

▼B

Kõnealuses meetodis kirjeldatud menetlused puudutavad peamiselt vahetu kokkusegamise ja preinkubatsioonimeetodit. Nende mõlema abil võidakse teha katseid koos metaboolse aktiveerimisega või ilma selleta. Mõned ained võivad olla paremini tuvastatavad preinkubatsioonimeetodi abil. Need ained kuuluvad keemilistesse aineklassidesse, kus on lühiahelalised alifaatsed nitrosoamiinid, metallid oksüdatsiooniastmega + 2, aldehüüdid, asovärvid ja diasoühendid, pürollisidiinalkaloidid, allüülühendid ja nitroühendid (3). Samuti on täheldatud, et teatud mutageenide klasse ei tuvastata alati standardmenetluste abil, nagu nt vahetu kokkusegamise meetodil või preinkubatsioonimeetodil. Neid tuleks vaadelda „erijuhtudena" ja on rangelt soovitatav, et nende tuvastamiseks kasutataks alternatiivseid menetlusi. Järgmised „erijuhud" on võimalik ära tunda (koos menetluste näidetega, mida võib nende tuvastamiseks kasutada): asovärvained ja diasoühendid (3, 5, 6, 13), gaasid ja lenduvad kemikaalid (12, 14, 15, 16) ning glükosiidid (17, 18). Kõrvalekaldeid standardmenetlustest on vaja teaduslikult põhjendada.

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. **Ettevalmistused**

1.5.1.1. *Bakterid*

Värsked bakterikultuurid tuleb kasvatada kuni hilise eksponentsiaalse või varase statsionaarse kasvufaasini (ligikaudu 10^9 rakku ml kohta). Hilises statsionaarses faasis olevaid kultuure ei tohiks kasutada. On oluline, et katses kasutatavad kultuurid sisaldaksid elujõuliste rakkude suuri tiitreid. Tiitrit võib näidata kas varasematest kontrollkatsetest saadud kasvukõverate abil või määrates igas analüüsis elujõuliste rakkude arv külvikatsel.

Soovitav inkubatsioonitemperatuur on 37 °C.

Tuleks kasutada vähemalt viit bakteritüve. Nende hulka peaks kuuluma neli tüve *S. typhimurium*'ilt (TA 1535; TA 1537 või TA97a või TA97; TA98; ja TA100), mida peetakse usaldusväärseteks ja mis on andnud reprodutseeritava vaste eri laborites. Nendes neljas *S. typhimurium*'i tüves on GC aluspaarid algses pöördmutatsioonisaidis ja on teada, et need ei avasta teatud oksüdeerivaid mutageene, ristseoseid moodustavaid aineid ja hüdrasiine. Selliseid aineid võib avastada *E. coli* WP2-tüvede või *S. typhimurium* TA1 02 (19) abil, millel on AT aluspaar algses pöördmutatsioonisaidis. Seetõttu on soovitavad tüvede kombinatsioonid järgmised:

— *S. typhimurium* TA1535;

— *S. typhimurium* TA1537 või TA97 või TA97a;

— *S. typhimurium* TA98;

— *S. typhimurium* TA100;

— *E. coli* WP2 uvrA või *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) või *S. typhimurium* TA102.

Ristseostuvate mutageenide avastamiseks on eelistatav kasutada TA1 02 või lisada DNA parandusele spetsiifilist *E. coli* tüve (nt *E. coli* WP2 või *E. coli* WP2 (pKMIOl)).

▼B

Tüvikultuuri preparaatide valmistamiseks, markeri verifitseerimiseks ja säilitamiseks tuleks kasutada väljakujunenud menetlusi. Kasvuks mõeldud aminohappe vajadust tuleks näidata iga külmutatud tüvikultuuri varupreparaadi puhul *(S. typhimurium*'i tüvede puhul histidiin ja *E. coli* tüvede puhul trüptofaan). Muid fenotüüpseid tunnuseid tuleks vastavalt kontrollida: R-faktori plasmiidide esinemist või puudumist, vajaduse korral (nt ampitsilliini resistentsus TA98, TA100 ja TA97a või TA97, WP2 uvrA ja WP2 uvrA (pKM101) tüvede puhul ning ampitsilliini + tetratsükliini resistentsus TA102 tüve puhul); iseloomulike mutatsioonide esinemine (nt tundlikkusest kristallvioleti suhtes põhjustatud rfa-mutatsioon *S. typhimurium*'is ja tundlikkusest ultravioletkiirguse suhtes põhjustatud uvrA-mutatsioon *E. coli*'is või uvrB-mutatsioon *S. typhimurium*'is) (2, 3). Tüved peaksid samuti andma plaatidel spontaansete revertantsete bakterite kolooniate loendamise tulemusi, mis vastavad laborite esinemissageduste kontrollandmete vahemikele ja kirjanduses eelistatult esitatud vahemikele.

1.5.1.2. *Sööde*

Kasutatakse sobivat minimaalset agarit (sisaldab nt Vogel-Bonneri minimaalset söödet E ja glükoosi) ja külviagarit, mis sisaldab histidiini ja biotiini või trüptofaani, mis võimaldavad raku jagunemist (1, 2, 9).

1.5.1.3. *Metaboolne aktiveerimine*

Bakterid puutuvad kokku uuritava ainega nii vastava metaboolse aktiveerimissüsteemi olemasolu kui ka puudumise korral. Enim kasutatav süsteem on ensüüme indutseerivate ainete, nt Aroclor 1254ga (1, 2) või fenobarbitooni ja β-naftoflavooni seguga (18, 20, 21) töödeldud näriliste maksast valmistatud postmitokondriaalne osa (S9), millele on lisatud kofaktor. Tavaliselt kasutatakse postmitokondriaalset fraktsiooni kontsentratsiooni vahemikus 5–30 mahuprotsenti S9-segus. Metaboolse aktiveerimissüsteemi valik ja tingimused võivad sõltuda uuritava keemilise aine klassist. Mõnel juhul on vaja kasutada postmitokondriaalse fraktsiooni rohkem kui üht kontsentratsiooni. Asovärvainete ja diasoühendite puhul võib olla sobivam kasutada redutseerivat metaboolse aktiveerimise süsteemi (6, 13).

1.5.1.4. *Uuritav aine/ettevalmistused*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajaduse korral lahjendada enne bakterite töötlemist. Vedelad uuritavad ained võib lisada vahetult katsesüsteemidesse ja/või lahjendada enne manustamist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

Lahusti/kandjaaine ei tohiks uuritava ainega keemiliselt reageerida ning see peaks sobima rakkude eluvõimelisuse ja S9 aktiivsusega (22). Kui kasutatakse muud kui tuntud lahustit/kandjaainet, siis peab selle kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/-kandjaaine kasutamist. Vees ebapüsivate ainete uurimisel kasutatavad orgaanilised lahustid peavad olema veevabad.

▼B

1.5.2. **Katsetingimused**

1.5.2.1. *Katsetüved (vt 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Manustamise kontsentratsioon*

Kasutatavate katseainete suurima koguse määramisel võetakse arvesse tsütotoksilisust ja lahustuvust lõplikus katsesegus.

Tsütotoksilisust ja lahustuvust võib olla kasulik määrata eelkatses. Tsütotoksilisust võib tuvastada töödeldud kultuurides revertantsete kolooniate arvu vähenemise, lausfooni selginemise või vähenemise või rakkude ellujäämisastme abil. Aine tsütotoksilisust võib muuta metaboolsete aktiveerimissüsteemide esinemise korral. Lahustumatust tuleks hinnata lõplikus segus palja silmaga nähtava sadestuse tekke põhjal tegelikes katsetingimustes.

Soovitatav suurim katsekontsentratsioon lahustuvate mittetoksiliste ainete kohta on 5 mg plaat või 5 µl plaat. Mittetoksiliste ainete puhul, mis on lahustumatud kontsentratsioonidel 5 mg plaadi kohta või 5 µl plaadi kohta, peaks üks või enam uuritavat kontsentratsiooni vastama lahustumatusele lõplikus katsesegus. Katseaineid, mis on tsütotoksilised juba kontsentratsioonidel alla 5 mg plaadi kohta või 5 µl plaadi kohta, tuleks testida tsütotoksilise kontsentratsiooni suhtes. Sadestus ei tohiks mõjutada tulemust.

Tuleks kasutada vähemalt viit erinevat analüüsitava katseaine kontsentratsiooni, mille korral on katsepunktidele vastav vahemik ligikaudu poollogaritmiline (nt $\sqrt{10}$). Kontsentratsioonsõltuvuse uurimisel võivad olla sobivamad väiksemad intervallid. Hinnates aineid, mis sisaldavad märkimisväärsel hulgal võimalikke mutageenseid lisandeid, võib kõne alla tulla katsete tegemine suuremate kontsentratsioonidega kui 5 mg plaadi kohta või 5 µl plaadi kohta.

1.5.2.3. *Negatiivsed ja positiivsed kontrollkatsed*

Igas katses kasutatakse paralleelseid positiivseid ja negatiivseid (lahusti või kandjaaine) kontrollkatseid nii metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta. Positiivsetes kontrollkatsetes kasutatavad kontsentratsioonid tuleb valida selliselt, et need näitaksid iga katse sooritamise tõhusust.

Metaboolset aktiveerimissüsteemi kasutavate katsete puhul tuleks välja valida positiivsete kontrollkatsete võrdlusaine(d) kasutatavate bakteritüvede tüübi põhjal.

Järgmised ained on näited sobivatest positiivsetest kontrollainetest metaboolse aktiveerimisega katsete jaoks:

Aine	CASi nr	EINECSi nr
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetüülantratseen
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetüülbens(α)antratseen
50-32-8	200-028-5	Benso(a)püreen
613-13-8	210-330-9	2-aminoantratseen

▼B

Aine	CASi nr	EINECSi nr
50-18-0		Tsüklofosfamiid
6055-19-2	200-015-4	Tsüklofosfamiidmonohüdraat

Järgmine aine on sobiv positiivseks kontrolliks redutseeriva metaboolse aktiveerimise meetodi jaoks:

Aine	CASi nr	EINECSi nr
Kongopunane	573-58-0	209-358-4

2-aminoantratseeni ei tohiks kasutada S9-segu tõhususe ainsa indikaatorina. Kui kasutatakse 2-aminoantratseeni, peaks iga S9-partiid samuti iseloomustama mutageeniga (nt benso[a]püreen, dimetüülbensantratseen), mis eeldab mikrosomaalse ensüümi tekitatud metaboolset aktiveerimist.

Järgmised ained on näited positiivsetest tüvele spetsiifilistest sobivatest kontrollainetest eksogeense metaboolse aktiveerimissüsteemiga katsete jaoks:

Aine	CASi nr	EINECSi nr	Tüvi
Naatriumasiid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 ja TA 100
2-nitrofluoreen	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridiin	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
Kumeenvesinikperoksiid	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA ja TA 102
l-metüül-3-nitro-l-nitrosoguanidiin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA (pKM101)
4-nitrokinoliin-1-oksiid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA (pKM101)
Furiilfuramiid (AF2)	3688-53-7		Plasmiidi sisaldavad tüved

Võidakse kasutada muid sobivaid positiivse kontrolli võrdlusaineid. Lähedasse keemilisse aineteklassi kuuluvate positiivsete keemiliste kontrollainete kasutamist tuleks kaaluda, kui selline aine on kättesaadav.

Tuleks kasutada negatiivseid kontrollaineid, mis sisaldavad üksnes lahustit või kandjaainet ilma katseaineta ja mida muidu manustatakse sarnasel viisil nagu katserühmade puhul. Lisaks sellele kasutatakse ka töötlemata kontrollkatseid, välja arvatud juhul, kui varasemad andmed kontrollaine kohta näitavad, et valitud lahusti ei indutseeri kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

▼B

1.5.3. **Menetlus**

Vahetu kokkusegamise meetodil (1, 2, 3, 4), ilma metaboolse aktiveerimiseta, segatakse 2,0 ml külviagariga tavaliselt 0,05 ml või 0,1 ml katselahuseid, 0,1 ml värskeid bakterikultuure (mis sisaldavad ligikaudu 10^8 elujõulist rakku) ja 0,5 ml steriilset puhvrit. Metaboolse aktiveerimisega katse puhul segatakse tavaliselt 0,5 ml metaboolse aktiveerimise segu, mis sisaldab piisaval hulgal postmitokondriaalset fraktsiooni (vahemikus 5–30 mahuprotsenti metaboolse aktiveerimise segus) külviagari (2,0 ml) ja bakterite ja uuritava aine/katselahusega. Iga katseklaasi sisu segatakse ja külvatakse minimaalse agarinõu pinnale. Külviagarit võib lasta tahkestuda enne inkubatsiooni.

Eelinkubatsioonimeetodi puhul (2, 3, 5, 6) eelinkubeeritakse uuritav aine/katselahus uuritava tüvega (mis sisaldab ligikaudu 10^8 elujõulist rakku) ja steriilse puhvriga või metaboolse aktiveerimise süsteemiga (0,5 ml) enamasti 20 minutit või kauem 30–37 °C juures enne külviagariga segamist ja külvatakse minimaalse agariplaadi pinnale. Tavaliselt segatakse 0,05 või 0,1 ml uuritavat ainet/katselahust, 0,1 ml baktereid ja 0,5 ml S9-segu või steriilset puhvrit 2,0 ml külviagariga. Katseklaase tuleks täita õhuga eelinkubatsiooni ajal, kasutades selleks loksutit.

Varieerumise piisavaks hindamiseks tuleks kasutada kolme paralleelset plaati iga annuse korral. Kahe paralleelse plaadi kasutamine on aktsepteeritav siis, kui seda on teaduslikult põhjendatud. Plaadi juhuslikul kaotsiminekul ei tunnistata katset ilmtingimata kehtetuks.

Gaasilisi või lenduvaid aineid uuritakse sobiva meetodi abil, näiteks suletud kasvuanumates (12, 14, 15, 16).

1.5.4. **Inkubatsioon**

Kõiki antud katse anumaid tuleks inkubeerida 37 °C juures 48–72 tundi. Pärast inkubatsiooniperioodi loendatakse kokku revertantsete kolooniate arv plaadi kohta.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Tulemused tuleks esitada revertantsete kolooniate arvuna plaadi kohta. Revertantsete kolooniate arv nii negatiivsete (lahusti kontrollkatse ja töötlemata kontrollkatse, kui seda kasutatakse) kui ka positiivsete kontrollplaatide korral tuleks esitada. Üksikute plaatide korral loendatud bakterite arvud, revertantsete kolooniate keskmine arv plaadi kohta ja standardhälve tuleks esitada uuritava aine ning positiivsete ja negatiivsete (töötlemata ja/või lahusti) kontrollkatsete kohta.

Selget positiivset vastust ei ole vaja verifitseerida. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel meelepäraselt muudetud katsetingimustes. Negatiivseid tulemusi kinnitatakse igal üksikjuhul eraldi. Neil juhtudel, kui negatiivsete tulemuste kinnitamist ei peeta vajalikuks, esitatakse põhjendus. Katse parameetrite muutmist hinnatud tingimuste vahemiku suurendamiseks tuleks arvesse võtta järelkatsetel. Katse parameetrid, mida võidakse muuta, hõlmavad kontsentratsioonivahemikku, manustamisviisi (vahetu kokkusegamise või vedeliku eelinkubatsiooni meetod) ja metaboolse aktiveerimise tingimusi.

▼B

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivse tulemuse määramise kriteeriumid, nagu näiteks kontsentratsiooniga seotud uuritava vahemiku suurenemine ja/või ühes või mitmes kontsentratsioonis revertantsete kolooniate arvu reprodutseeruv suurenemine plaadil vähemalt ühe tüve korral süsteemis koos metaboolse aktiveerimisega või ilma selleta (23). Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (24). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse saamiseks.

Uuritavat ainet, mille tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse mittemutageenseks aineks käesolevas katses.

Kuigi enamikul katsetest on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud korduskatsete arvust sõltumata.

Bakterite pöördmutatsioonkatse positiivsed tulemused näitavad, et aine põhjustab punktmutatsioone aluste asendamise või *Salmonella typhimurium*'i ja/või *Escherichia coli* genoomi raaminihke abil. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et uuritav aine ei ole katsetingimustes mutageenne uuritavate liikide puhul.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Lahusti/kandjaaine:

— kandjaaine valiku põhjendus;

— uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Tüved:

— kasutatavad tüved;

— rakkude arv rakukultuuri kohta;

— tüvede omadused.

Katsetingimused:

— uuritava aine hulk plaadi kohta (mg plaadi kohta või µl plaadi kohta) annuse valiku põhjendusega ja plaatide arvuga ühe kontsentratsiooni kohta;

— kasutatavad söötmed;

— metaboolse aktiveerimise süsteemi tüüp ja koostis, sh selle vastuvõetavuse kriteeriumid;

— manustamismenetlused

Tulemused:

— toksilisuse tunnused;

— sadestuse tunnused;

— individuaalsed loendusandmed plaadi kohta;

▼B

— revertantsete kolooniate keskmine arv plaadi kohta ja standardhälve;

— doosi ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral;

— võimalikud statistilised analüüsid;

— paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollkatsete andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;

— varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollkatsete andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

1) Arnes, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347–364.

2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (19 8 3), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, pp. 173–215.

3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, pp. 217–233.

4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 168, pp. 69–240.

5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters 1, pp. 91–96.

6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Nor-poth K. H. and Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273–285.

7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13–61.

8) Aeschacher, H. U, Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods,/. Food Safety, 8, pp. 167–177.

9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, Mutation Res., 38, pp. 33–42.

10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141–161.

▼B

11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453–465.

12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, pp. 335–344.

13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, pp. 33–47.

14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. Mol. Mutagen., 19, pp. 2–141.

15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in Progress in GeneticToxicology, D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249–258.

16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, pp. 421–441.

17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (19 79), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in Salmonella typhimurium, Cancer Res., 39, pp. 3780–3782.

18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961–4965.

19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285–291.

20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlori-nated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85–88.

21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175–177.

22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343–350.

23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83–91.

▼B

24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28–65.

▼M7

_____

_____

▼**M8**

B.17. **HPRT VÕI XPRT GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO* GEENIMUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 476 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Käesolevas katsemeetodi B.17 muudetud versioonis kajastuvad selle katse tegemisel saadud peaaegu kolmekümne aasta pikkused kogemused ja samuti tulemused, mis on saadud tümidiini kinaasi geenil põhineva, imetajarakkudega tehtava *in vitro* geenimutatsioonikatse jaoks uue eraldi meetodi väljatöötamise käigus. Katsemeetod B.17 kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

2. Käesoleva meetodi kohase imetajarakkudega läbi viidava *in vitro* geenimutatsioonikatse eesmärk on tuvastada kemikaalide põhjustatud geenimutatsioone. Kõnealustes katsetes kasutatakse rakuliine, mis võimaldavad tuvastada otsemutatsioone reportergeenides, täpsemalt endogeenses hüpoksantiini-guaniini fosforibosüültransferaasi geenis (näriliserakkudes *Hprt* ja inimese rakkudes *HPRT*; käesolevas katsemeetodis viidatakse neile koos kui geenile *Hprt* ning vastavale katsele kui HPRT-katsele) ja ksantiini-guaniini fosforibosüültransferaasi transgeenis (*gpt*) (vastavale katsele viidatakse kui XPRT-katsele). HPRT- ja XPRT-mutatsioonikatsega tuvastatakse eri geneetilisi muutusi. Asjaolu, et transgeen *gpt* paikneb autosoomil, võimaldab tuvastada peale HPRT-katsega kindlaks tehtavate mutatsioonide (nt aluspaarivahetused, raaminihked, väikesed deletsioonid ja insertsioonid) ka suurtest deletsioonidest ja võimalikust mitootilisest rekombinatsioonist põhjustatud mutatsioone, mida HPRT-katsega pole võimalik tuvastada, kuna geen *Hprt* paikneb X-kromosoomil (2, 3, 4, 5, 6, 7). XPRT-katset kasutatakse regulatiivsel eesmärgil praegu vähem kui HPRT-katset.

3. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. *In vitro* katsete puhul tuleb metabolismi aktiveerimiseks üldjuhul kasutada eksogeenset allikat. Eksogeenne metabolismi aktiveerimise süsteem ei võimalda täielikult matkida *in vivo* tingimusi.

5. Tuleks hoiduda kasutamast tingimusi, mille puhul saadakse valepositiivseid tulemusi, mis ei ole põhjustatud uuritava kemikaali vahetust interaktsioonist raku geneetilise materjaliga (st võib esineda vastastikmõju katsesüsteemiga); sellised tingimused hõlmavad pH või osmolaalsuse muutusi (8, 9, 10), söötme koostisosadega reageerimist (11, 12) ja liiga suurt tsütotoksilisust (13). HPRT-katse puhul loetakse liiga suureks tsütotoksilisuseks punktis 19 määratletud soovitatavat suurimat tsütotoksilisuse määra ületavat tsütotoksilisust.

▼**M8**

6. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

KATSE PÕHIMÕTE

7. Mutantsed rakud, millel on HPRT-katse puhul kadunud HPRT ensümaatiline aktiivsus ja XPRT-katse puhul XPRT ensümaatiline aktiivsus, on puriini analoogi 6-tioguaniini tsütostaatilise toime suhtes resistentsed. Rakud, kus on olemas *Hprt* (HPRT-katse puhul) või *gpt* (XPRT-katse puhul), on aga 6-tioguaniini suhtes tundlikud ning see aine pärsib neis rakkudes ainevahetust ja peatab rakkude edasise jagunemise. Seega on mutantsed rakud võimelised 6-tioguaniini juuresolekul paljunema, ent normaalsed rakud, kus on olemas *Hprt* (HPRT-katse puhul) või *gpt* (XPRT-katse puhul), seda ei suuda.

8. Rakususpensioon või ühekihiline rakukultuur viiakse sobivaks ajavahemikuks (3–6 tunniks) kokkupuutesse uuritava kemikaaliga – nii koos metabolismi aktiveeriva eksogeense allikaga kui ka ilma selleta (vt punkt 14) – ning seejärel külvatakse rakud ümber, et hinnata tsütotoksilisust ja võimaldada fenotüübi avaldumist enne mutantide selekteerimist (14, 15, 16, 17). Tsütotoksilisust hinnatakse suhtelise elulemuse, st kloonimistõhususe järgi, mis tehakse kindlaks kohe pärast töötlemist ja mida kohandatakse lähtuvalt rakkude arvu võimalikust vähenemisest negatiivse kontrolliga võrreldes (punkt 18 ja 2. liide). Töödeldud kultuure kasvatatakse söötmes rakutüübist sõltuva ajavahemiku vältel, mis on piisav tekkinud mutatsioonide fenotüüpide võimalikult optimaalseks avaldumiseks (tavaliselt vähemalt 7–9 päeva). Fenotüübi avaldumise järgselt külvatakse teadaolev arv rakke muteerumissageduse määramiseks nii söötmesse, mis sisaldab mutantsete kolooniate tuvastamist võimaldavat selektiivainet, kui ka selektiivaineta söötmesse, et teha kindlaks kloonimistõhusus (eluvõimelisus). Sobiva inkubatsiooniperioodi lõppedes kolooniad loendatakse. Muteerumissagedus arvutatakse mutantsete kolooniate arvu põhjal, mida on korrigeeritud lähtuvalt kloonimistõhususest mutantide selekteerimise ajal.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Rakud

9. HPRT- ja XPRT-katses kasutatavate rakutüüpide puhul peaks olema tõendatud, et asjaomased rakud on keemiliste mutageenide suhtes tundlikud, nende kloonimistõhusus on suur, neil on püsiv karüotüüp ja nende spontaanse muteerumise sagedus on püsiv. HPRT-katses kõige sagedamini kasutatavate rakkude hulka kuuluvad hiina hamstri rakuliinid CHO, CHL ja V79, hiire lümfoomi rakuliin L5178Y ja inimese lümfoblastoidne rakuliin TK6 (18, 19). XPRT-katses kasutatakse rakuliinist CHO saadud liini AS52, mis sisaldab transgeeni *gpt* ja kust on eemaldatud geen *Hprt* (20, 21); AS52 rakke ei saa kasutada HPRT-katses, kuna *Hprt* on neist eemaldatud. Muude rakuliinide kasutamist tuleks põhjendada ja need peaksid olema valideeritud.

10. Rakuliine tuleks regulaarselt kontrollida, et veenduda modaalse kromosoomiarvu püsivuses ning mükoplasmasaastuse puudumises (22, 23); saastunud rakkude ja muutunud modaalse kromosoomiarvuga rakkude kasutamisest tuleks hoiduda. Tuleks kindlaks teha katseid läbi viivas laboris aluseks võetav tavapärane rakutsükli kestus, mis peaks vastama asjaomaste rakkude

▼M8

kohta avaldatud näitajatele. Samuti tuleks kontrollida spontaanse muteerumise sagedust rakkude tüvikultuuris ja kui muteerumissagedus on vastuvõetamatu, ei tohiks seda tüvikultuuri kasutada.

11. Enne käesoleva meetodi kohases katses kasutamist võib olla vaja puhastada kultuurid olemasolevatest mutantsetest rakkudest; selleks võib kasvatada neid HPRT-katse puhul näiteks HAT-söötmes ja XPRT-katse puhul MPA-söötmes (5, 24) (vt 1. liide). Puhastatud rakud võib krüosäilitada ja seejärel töökultuurina kasutamiseks üles sulatada. Katses võib kasutada värskelt sulatatud töökultuuri pärast rakkude arvu tavapärase kahekordistumisaja saavutamist. XPRT-katse puhul tuleks AS52 rakkude tavapärasel kultiveerimisel kasutada tingimusi, millega tagatakse transgeeni *gpt* säilimine (20).

Söötmed ja kultiveerimistingimused

12. Rakukultuuride kasvatamisel tuleks kasutada sobivat söödet ja sobivaid inkubeerimistingimusi (kasvunõud, 5-protsendilise CO_2-sisaldusega niiske atmosfäär, inkubeerimistemperatuur 37 °C). Kultiveerimisel tuleks alati järgida tingimusi, millega tagatakse rakkude püsimine logaritmilises kasvufaasis. On väga oluline valida söötmed ja kasvutingimused nii, et oleks tagatud rakkude optimaalne kasv ekspressiooniperioodil ning optimaalne kloonimistõhusus nii muteerunud kui ka muteerumata rakkude puhul.

Rakukultuuride ettevalmistamine

13. Rakkude paljundamiseks tüvikultuurist külvatakse need söötmesse sellise tihedusega, et rakkude eksponentsiaalne kasv suspensioonis või ühekihilises kultuuris jätkuks kogu töötlemis- ja ekspressiooniperioodi vältel (nt tuleks ühekihiliselt kasvavate rakkude puhul ära hoida konfluentsuse teket).

Metabolismi aktiveerimine

14. Kui kasutatavate rakkude endogeenne metaboliseerimisvõime on ebapiisav, tuleks kasutada eksogeenseid metabolismisüsteeme. Kui ei ole teisiti põhjendatud, soovitatakse üldjuhul kasutada kõige sagedamini rakendatavat süsteemi, mis koosneb näriliste (tavaliselt roti) maksast valmistatud, mitokondrite eemaldamisel saadud fraktsioonist S9, millele on lisatud kofaktoreid ning mida on töödeldud selliste ensüümiinduktoritega nagu Aroclor 1254 (25, 26, 27, 28) või fenobarbitaali ja β-naftoflavooni kombinatsioon (29, 30, 31, 32). Viimati nimetatud kombinatsiooni kasutamine ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (33) ning see on osutunud monooksügenaaside induktorina sama tõhusaks kui Aroclor 1254 (29, 31). Fraktsiooni S9 kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonis 1–2 mahuprotsenti, kuid selle kontsentratsiooni lõplikus katsesöötmes võib suurendada kuni 10 mahuprotsendini. Kasutatava eksogeense metabolismi aktiveerimise süsteemi või ensüümiinduktori liigi ja kontsentratsiooni valikut võib mõjutada uuritava aine klass (34, 35, 36).

Uuritava kemikaali ettevalmistamine

15. Enne rakkude töötlemist tuleks tahke uuritav kemikaal lahustada sobivas lahustis ja vajaduse korral tuleks saadud lahust lahjendada (vt punkt 16). Vedelat uuritavat kemikaali võib lisada otse katsesüsteemi või seda enne lisamist lahjendada. Gaasilise või lenduva kemikaali kasutamisel tuleks standardmeetodit asjakohaselt muuta, näiteks viia kemikaaliga töötlemine läbi suletud kultiveerimisnõus (37, 38). Uuritav kemikaal tuleks katseks ette valmistada vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui püsivuse andmetest nähtub, et kemikaali säilitamine on vastuvõetav.

▼M8

KATSETINGIMUSED

Lahustid

16. Lahusti tuleks valida nii, et oleks tagatud uuritava kemikaali optimaalne lahustumine, kuid lahusti ei mõjutaks samal ajal negatiivselt katse käiku näiteks rakkude kasvukiiruse või uuritava kemikaali omaduste muutmise, kultiveerimisnõuga reageerimise või metabolismi aktiveerimise süsteemi kahjustamise teel. Esmajärjekorras soovitatakse võimaluse korral kaaluda veepõhise lahusti (või söötme) kasutamist. Tavapäraselt kasutatavad lahustid on näiteks vesi ja dimetüülsulfoksiid. Üldjuhul ei tohiks orgaanilise lahusti sisaldus töötlemiseks kasutatavas lõppsöötmes ületada 1 mahuprotsenti ja veepõhise lahusti (füsioloogilise lahuse või vee) sisaldus 10 mahuprotsenti. Kui kasutatakse tavapärasest erinevat lahustit (nt etanooli või atsetooni), tuleks esitada tõendavad andmed selle sobivuse kohta uuritava kemikaali ja katsesüsteemi puhul ning genotoksilise toime puudumise kohta kasutataval kontsentratsioonil. Selliste tõendavate andmete puudumisel on oluline lisada katsesse kemikaaliga töötlemata kontrollid (vt 1. liide), et tõendada valitud lahustist tuleneva kahjuliku või mutageense toime puudumist.

Tsütotoksilisuse mõõtmine ja kokkupuutekontsentratsioonide valimine

17. Uuritava kemikaali suurima kontsentratsiooni valimisel tuleks hoiduda valimast kontsentratsiooni, mille puhul on võimalik saada valepositiivseid tulemusi, näiteks tulenevalt liiga suurest tsütotoksilisusest (vt punkt 20), söötmes sadenemisest (vt punkt 21) või pH või osmolaalsuse olulisest muutumisest (vt punkt 5). Kui uuritav kemikaal muudab lisamise hetkel oluliselt söötme pH-d, võib pH reguleerimiseks lisada töötlemiseks kasutatavasse lõppsöötmesse puhvrit, et hoida ära valepositiivsete tulemuste saamist ja säilitada sobivad kultiveerimistingimused.

18. Kontsentratsioonide valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest ja muudest kaalutlustest (vt punktid 20–22). Ehkki tsütotoksilisuse hindamine eelkatses võib põhikatses kasutatavate kontsentratsioonide täpsemaks kindlakstegemiseks kasulikuks osutuda, ei ole eelkatse tegemine kohustuslik. Põhikatses on tsütotoksilisuse mõõtmine igas kultuuris vajalik ka juhul, kui tsütotoksilisust on eelnevalt juba hinnatud. Tsütotoksilisuse hindamiseks tuleks kasutada suhtelist elulemust, st võrrelda vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusust, mida on kohandatud rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise ajal, kloonimistõhususe kohandatud väärtusega negatiivsete kontrollide puhul, mille elulemuseks loetakse 100 % (vt valem 2. liites).

19. Kemikaali tuleks hinnata vähemalt neljal nõuetekohasuse kriteeriumidele (sobiv tsütotoksilisuse määr, rakkude arv jne) vastaval katsekontsentratsioonil (see ei hõlma lahustiga kontrolli ega positiivseid kontrolle). Töötlemisel on soovitatav kasutada iga katsekontsentratsiooni puhul kahte paralleelkultuuri, ent võib kasutada ka suuremat arvu paralleelkultuure või ühteainsat kultuuri. Iga kontsentratsiooni puhul tuleks sõltumatute paralleelkultuuridega saadud tulemused esitada eraldi, kuid andmeanalüüsi jaoks võib need koondada (17). Uuritavate kemikaalide puhul, mille tsütotoksilisus on väike või millel see puudub, sobivad tavaliselt kontsentratsioonid, mis erinevad üksteisest umbes kaks kuni kolm korda. Tsütotoksilisuse esinemisel peaksid valitud katsekontsentratsioonid hõlmama vahemikku tsütotoksilisuse ilmnemise kontsentratsioonist kuni kontsentratsioonideni, mille juures täheldatakse mõõdukat ja väikest või olematut tsütotoksilisust. Paljudel uuritavatel kemikaalidel on toime kontsentratsioonist sõltuvuse kõver järsu tõusuga ning tsütotoksilisuse

▼M8

täieulatuslikuks iseloomustamiseks või kontsentratsioonist sõltuvuse üksikasjalikuks uurimiseks võib olla vaja kasutada üksteisest vähem erinevaid kontsentratsioone ja enam kui nelja kontsentratsiooni, eriti olukorras, kus on vaja teha korduskatse (vt punkt 43). Enam kui nelja kontsentratsiooni kasutamine võib osutuda eriti oluliseks, kui kasutatakse ühteainsat kultuuri.

20. Kui suurima kontsentratsiooni valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest, tuleks see kontsentratsioon valida nii, et saavutataks suhteline elulemus 10–20 %. Selliste positiivsete tulemuste tõlgendamisel, mille puhul täheldatav suhteline elulemus on vaid 10 % või väiksem, tuleks olla ettevaatlik (punkt 43).

21. Raskesti lahustuva uuritava kemikaali puhul, mis ei ole tsütotoksiline kontsentratsioonidel, mis on väiksemad kui vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, peaks suurimal analüüsitaval kontsentratsioonil olema pärast kemikaaliga töötlemise lõppemist täheldatav hägusus või silma või invertmikroskoobiga nähtav sade. Isegi kui tsütotoksilisus avaldub suuremal kontsentratsioonil kui vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, on soovitatav teha katse ainult ühel sellisel kontsentratsioonil, mille puhul tekib hägusus või nähtav sade, sest sade võib põhjustada katsevigu. Sademe moodustumise kontsentratsiooni puhul tuleb hoolikalt veenduda, et sade ei mõjuta katse käiku. Enne katse alustamist võib olla kasulik määrata kemikaali lahustuvus söötmes.

22. Kui ei täheldata ei sadet ega liigset tsütotoksilisust, peaks suurim katsekontsentratsioon olema vähim järgmistest kontsentratsioonidest: 10 mM, 2 mg/ml või 2 µl/ml (39, 40). Kui uuritava kemikaali koostis ei ole määratav, näiteks kui see on tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB) (41), keskkonnast saadud ekstrakt vms, võib juhul, kui ei täheldata kemikaali piisavat tsütotoksilisust, olla vaja selle iga koostisosa kontsentratsiooni suurendamiseks kasutada suuremat maksimumkontsentratsiooni (nt 5 mg/ml). Tuleks siiski märkida, et inimravimite puhul võivad need nõuded olla teistsugused (42).

Kontrollid

23. Iga katserežiimi puhul tuleks kasutada paralleelseid negatiivseid kontrolle (vt punkt 16), mille puhul töötlemiseks kasutatavale söötmele lisatakse vaid lahusti ja kultuure käideldakse muus osas samamoodi kui uuritava kemikaaliga töödeldud kultuure.

24. Paralleelsete positiivsete kontrollide kasutamine on vajalik, et tõendada labori pädevust tuvastada rakendatavale katsemeetodile vastavates tingimustes mutageene ning vajaduse korral veenduda metabolismi eksogeense aktiveerimise süsteemi tõhususes. Positiivsete kontrollide näited on esitatud allpool tabelis 1. Kui see on põhjendatud, võib positiivse kontrollina kasutada mõnda muud ainet. Kuna *in vitro* genotoksilisuse katsed imetajarakkudega on piisavalt standarditud, võib katsetes, kus kasutatakse töötlemist koos metabolismi eksogeense aktiveerimisega ja ilma selleta, kasutada üksnes sellist positiivset kontrolli, mis nõuab metabolismi aktiveerimist. Sel juhul võimaldab kõnealuse üheainsa positiivse kontrolliga saadud tulemus tõendada nii metabolismi aktiveerimise süsteemi toimimist kui ka katsesüsteemi reageerimisvõimet. Iga positiivse kontrolli puhul tuleks kasutada ühte või mitut kontsentratsiooni, mille juures võib eeldada, et saadakse tausttaset reprodutseeritavalt ja tuvastatavalt ületavad tulemused, mis võimaldavad tõendada katsesüsteemi tundlikkust, ning samal ajal ei tohiks tulemused olla mõjutatud käesolevas katsemeetodis sätestatud piirmäära ületavast tsütotoksilisusest (vt punkt 20).

▼M8

Tabel 1

Labori pädevuse hindamiseks ja positiivsete kontrollide valimiseks soovitatavad võrdlusained

Metabolismi aktiveerimise kasutamine	Lookus	Aine ja CASi nr
Metabolismi eksogeenset aktiveerimist ei kasutata	*Hprt*	Etüülmetaansulfonaat [CASi nr: 62-50-0] Etüülnitrosouurea [CASi nr: 759-73-9] 4-nitrokinoliin-1-oksiid [CASi nr: 56-57-5]
	xprt	Streptonigriin [CASi nr: 3930-19-6] Mitomütsiin C [CASi nr: 50-07-7]
Kasutatakse metabolismi eksogeenset aktiveerimist	*Hprt*	3-metüülkolantreen [CASi nr: 56-49-5] 7,12-dimetüülbensantratseen [CASi nr: 57-97-6] Benso[*a*]püreen [CASi nr: 50-32-8]
	xprt	Benso[*a*]püreen [CASi nr: 50-32-8]

KATSE KÄIK

Uuritava kemikaaliga töötlemine

25. Paljunevaid rakke töödeldakse uuritava kemikaaliga nii metabolismi aktiveerimise süsteemi juuresolekul kui ka ilma selleta. Kokkupuuteperiood peab olema sobiva pikkusega (tavaliselt piisab 3–6 tunnist).

26. Rakkude minimaalse arvu valimisel iga kultuuri (nii kontroll- kui ka töödeldud kultuuride) ja iga katseetapi jaoks tuleks lähtuda spontaanse muteerumise sagedusest. Üldsuunisena tuleks võtta töötlemiseks ja ümberkülvamiseks piisav hulk rakke, et tagada igas katseetapis 10 mutandi spontaanne teke igas kultuuris (17). Spontaanse muteerumise sagedus jääb üldjuhul vahemikku 5 kuni 20×10^{-6}. Kui spontaanse muteerumise sagedus on 5×10^{-6}, on piisava arvu mutantide (vähemalt 10) spontaanse tekke tagamiseks ka kultuurides, mida on töödeldud kontsentratsioonil, mille juures töötlemisest tulenev tsütotoksilisus on 90 % (suhteline elulemus on 10 %), vaja võtta töötlemiseks vähemalt 20×10^{6} rakku. Peale selle tuleb ekspressiooniperioodi vältel kultiveerida ja mutantide selekteerimiseks välja külvata piisaval arvul rakke (alati vähemalt kaks miljonit rakku) (17).

Fenotüübi avaldumise aeg ja muteerumissageduse mõõtmine

27. Töötlemisperioodi lõppedes kasvatatakse rakke kultuuris, et võimaldada mutantse fenotüübi avaldumist. Uute tekkinud *Hprt*- ja *xprt*-mutantide fenotüübi optimumilähedaseks avaldumiseks piisav miinimumperiood on tavaliselt 7–9 päeva (43, 44). Selle ajavahemiku vältel külvatakse rakke regulaarselt ümber, et tagada nende eksponentsiaalne kasv. Pärast fenotüübi avaldumist külvatakse rakud nii selektiivainet 6-tioguaniini sisaldavasse kui ka ilma selektiivaineta söötmesse, et teha kindlaks vastavalt mutantide arv ja selekteerimisaegne kloonimistõhusus. Sellisel külvamisel võib ühekihiliste kultuuride puhul kasutada tasse ja suspensioonina kasvavate rakkude puhul mikrotiiterplaate. Mutantide selekteerimiseks tuleks rakud välja külvata sellisel tihedusel, millega tagatakse optimaalne mutantide tuvastamine (st metaboolne koostöö on takistatud) (17). Rakke kasvatatakse kolooniate optimaalseks kasvuks sobiva ajavahemiku vältel (nt 7–12 päeva) ning seejärel loendatakse kolooniad. Muteerumissagedus arvutatakse mutantsete kolooniate arvu põhjal, mida on korrigeeritud lähtuvalt kloonimistõhusust mutantide selekteerimise ajal (valemid on esitatud 2. liites).

▼M8

Labori pädevus

28. Laboris peaks enne katsemeetodi rutiinset kasutamist olema katse läbiviimiseks piisava kogemuse omandamiseks tehtud katseseeria positiivse kontrollina kasutatud võrdlusainetega, millel on eri toimemehhanismid (tabelis 1 loetletud ainete hulgast valitud ained, millest vähemalt üks vajab toimimiseks metabolismi aktiveerimist ja vähemalt üks seda ei vaja), ning eri negatiivsete kontrollidega (eri lahustite/kandeainetega). Selliste positiivsete ja negatiivsete kontrollidega saadud tulemused peaksid olema kooskõlas kirjanduse andmetega. Seda nõuet ei kohaldata kogemusega laborite puhul, kus on olemas varasemate tulemuste andmebaas, nagu on määratletud punktides 30–33.

29. Positiivseks kontrolliks valitud aineid (vt tabel 1 punktis 25) tuleks uurida nii aktiveeritud kui ka aktiveerimata metabolismi tingimustes, et tõendada mutageensete kemikaalide tuvastamise ja metabolismi aktiveerimise süsteemi tõhususe kindlakstegemise võimekust, samuti rakkude kasvutingimuste sobivust töötlemise, fenotüübi avaldumise ja mutantide selekteerimise ajal ning kasutatavate hindamismeetodite asjakohasust. Kõnealuste valitud ainete puhul tuleb katsesüsteemi tundlikkuse ja dünaamilise kasutusulatuse sobivuse tõendamiseks valida kontsentratsioonivahemikud nii, et oleks võimalik saada reprodutseeritavaid tausttaset ületavaid kontsentratsioonist sõltuvaid tulemusi.

Varasemad andmed kontrollide kohta

30. Laboris tuleks kindlaks teha:

— positiivse kontrolliga saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus,

— negatiivsete kontrollidega (töötlemata rakud, lahustiga kontroll) saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus.

31. Kui negatiivseid kontrolle iseloomustavate tulemuste jaotuse kindlakstegemiseks kogutakse andmeid esmakordselt, peaksid paralleelsete negatiivsete kontrollidega saadud andmed olema kooskõlas kontrolle käsitlevate avaldatud andmetega (22). Kontrollidega saadud tulemuste jaotuse lähteandmetele üha uute katseandmete lisandumisel peaksid paralleelsete negatiivsete kontrollide puhul täheldatavad tulemused jääma ideaaljuhul selle jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 % (17, 45, 46).

32. Laboris negatiivsete kontrollidega saadud varasemate tulemuste andmebaas peaks algselt hõlmama vähemalt 10 katse andmeid, kuid soovitatavalt peaks see sisaldama vähemalt 20 võrreldavates tingimustes tehtud katse andmeid. Laboris tuleks kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, näiteks kontrollkaarte (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (47)), et teha kindlaks, kui suures ulatuses positiivsete ja negatiivsete kontrollide andmed varieeruvad, ja tõendada, et laboris kasutatav metoodika on usaldusväärne (46). Varasemate katseandmete kogumist ja kasutamist käsitlevaid täiendavaid soovitusi (varasematele andmetele uute tulemuste lisamise või lisamata jätmise kriteeriumid ja konkreetse katse andmete vastuvõetavuse kriteeriumid) võib leida kirjandusest (45).

33. Negatiivsete kontrollidega saadud andmed peaksid hõlmama muteerumissagedust ühes või soovitatavalt mitmes paralleelses kultuuris, nagu on kirjeldatud punktis 23. Paralleelsete negatiivsete kontrollidega saadud tulemused peaksid ideaaljuhul jääma laboris negatiivsete kontrollidega saadud varasemate tulemuste jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 % (17, 45, 46). Kui paralleelsete negatiivsete kontrollidega saadud tulemused jäävad väljapoole kõnealust usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %, võivad need olla kontrollidega saadud varasemate tulemuste jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmuslike võõrväärtustega ning on tõendatud, et katsesüsteem on usaldusväärne (vt eespool), ja puuduvad tõendid selle kohta, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksimusega.

▼M8

34. Katsemeetodi mis tahes muudatuse puhul tuleks kaaluda, kas see mõjutab katseandmete vastavust laboris kontrollidega varem saadud olemasolevatele andmetele. Iga olulise mittevastavuse korral tuleks luua uus kontrollidega saadud varasemate tulemuste andmebaas.

ANDMED JA ARUANDLUS

Tulemuste esitamine

35. Esitatavad tulemused peaksid hõlmama kõiki vajalikke andmeid suhtelise elulemuse kaudu väljendatud tsütotoksilisuse arvutamiseks. Andmed nii töödeldud kultuuride kui ka kontrollkultuuride kohta peaksid hõlmama rakkude arvu töötluse lõppedes, vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude arvu ja kolooniate arvu (või mikrotiiterplaadi kasutamisel nende kannude arvu, milles kolooniad puudusid). Suhteline elulemus igas kultuuris tuleks esitada protsentuaalse osakaaluna väärtusest, mis on saadud paralleelse lahustit sisaldava kontrolli puhul (mõisted on määratletud 1. liites).

36. Esitatavad tulemused peaksid samuti hõlmama kõiki vajalikke andmeid muteerumissageduse arvutamiseks. Andmed nii töödeldud kultuuride kui ka kontrollkultuuride kohta peaksid hõlmama 1) koos selektiivainega ja ilma selektiivaineta välja külvatud rakkude arvu (mutantide selekteerimiseks rakkude väljakülvamise hetkel) ning 2) selektiivaine juuresolekul ja ilma selleta kasvanud kultuurides loetletud kolooniate arvu (või mikrotiiterplaadi kasutamisel nende kannude arvu, milles kolooniad puudusid). Muteerumissagedus arvutatakse selektiivaine juuresolekul tekkinud mutantsete kolooniate arvu põhjal, mida on korrigeeritud lähtuvalt selektiivaineta kultuurides täheldatud kloonimistõhususest. Muteerumissagedus tuleks esitada muteerunud rakkude arvuna miljoni eluvõimelise raku kohta (mõisted on määratletud 1. liites).

37. Andmed tuleks esitada iga kultuuri kohta eraldi. Peale selle tuleks kõik andmed esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

38. Katse nõuetekohaseks tunnistamine põhineb järgmistel kriteeriumidel:

— paralleelse negatiivse kontrolliga saadud tulemused loetakse laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste andmebaasi lisamiseks vastuvõetavaks, nagu on kirjeldatud punktis 33;

— paralleelsete positiivsete kontrollidega (vt punkt 24) saadud tulemused peaksid olema võrreldavad positiivsete kontrollidega varem saadud tulemustega ning saadud väärtused peaksid paralleelset negatiivset kontrolli iseloomustavate väärtustega võrreldes olema statistiliselt oluliselt suuremad;

— katse on tehtud kahes eri tingimuses (st metabolismi aktiveerimisega ja ilma selleta), välja arvatud juhul, kui neist ühe puhul on saadud positiivsed tulemused (vt punkt 25);

— rakkude ja kontsentratsioonide arv on analüüsimiseks piisav (punktid 25, 26 ja 19);

— suurima kontsentratsiooni valimise kriteeriumid on kooskõlas punktides 20, 21 ja 22 kirjeldatud kriteeriumidega.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

39. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritava kemikaaliga saadud tulemust selgelt positiivsena, kui mis tahes kasutatud katsetingimustes on täidetud järgmised kriteeriumid:

▼M8

— vähemalt ühel katsekontsentratsioonil täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;

— sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et see suurenemine on kontsentratsioonist sõltuv;

— mis tahes saadud tulemus jääb väljapoole laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste jaotust (nt väljapoole Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %; vt punkt 33).

Kui kõik need kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama selles katsesüsteemis geenimutatsioone kultiveeritud imetajarakkudes. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud kirjanduses (46, 48).

40. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt negatiivseks, kui kõikides kasutatud katsetingimustes on täidetud järgmised kriteeriumid:

— ühelgi katsekontsentratsioonil ei täheldata saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;

— sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et kontsentratsioonist sõltuvat väärtuse suurenemist ei esine;

— kõik tulemused jäävad laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste jaotusvahemikku (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %; vt punkt 33).

Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama selles katsesüsteemis geenimutatsioone kultiveeritud imetajarakkudes.

42. Selgelt positiivset või negatiivset tulemust ei ole vaja üle kontrollida.

43. Juhul, kui tulemus ei ole eespool kirjeldatu kohaselt selgelt negatiivne ega selgelt positiivne või kui eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdihinnangut ja/või täiendavaid uuringuid. Sellises olukorras võib olla kasulik teha korduskatse ja muuta vajaduse korral katsetingimusi (nt kontsentratsiooniintervalli või metabolismi aktiveerimise tingimusi – S9 kontsentratsiooni või S9 päritolu).

44. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavaid uuringuid teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne. Seepärast tuleks sel juhul lugeda uuritava kemikaaliga saadud tulemus ebaselgeks (seda tõlgendatakse positiivse ja negatiivse tulemuse võrdvõimalikkusena).

Katseprotokoll

45. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;

— uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;

— vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist;

▼**M8**

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Lahusti:

— lahusti valimise põhjendus;

— lahusti protsentuaalne sisaldus lõppsöötmes.

Rakud:

labori tüvikultuuride puhul:

— rakuliinide tüüp ja päritolu;

— võimaluse korral ümberkülvide arv ja laboris rakuliinidega tehtud varasemate toimingute andmed;

— karüotüübi andmed ja/või kromosoomide modaalarv;

— rakukultuuride säilitamise meetodid;

— teave mükoplasma puudumise kohta;

— rakkude arvu kahekordistumise aeg.

Katsetingimused:

— kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valiku põhjendus, sealhulgas näiteks andmed tsütotoksilisuse ja lahustuvuspiirangute kohta;

— söötme koostis, CO_2 kontsentratsioon, niiskusesisaldus;

— uuritava kemikaali kontsentratsioon, väljendatuna lõppkontsentratsioonina söötmes (nt µg/ml või mg/ml või mM);

— söötmele lisatud lahusti ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (ja/või ruumala);

— inkubeerimistemperatuur;

— inkubeerimisaeg;

— töötluse kestus;

— rakkude tihedus töötluse ajal;

— metabolismi aktiveerimise süsteemi liik ja koostis (fraktsiooni S9 allikas, S9 segu valmistamise meetod, S9 segu ja S9 kontsentratsioon või ruumala lõppsöötmes, S9 kvaliteedikontrolli andmed);

— positiivse või negatiivse kontrollina kasutatud ained ja nende lõppkontsentratsioonid iga töötlemistingimuse puhul;

▼**M8**

— ekspressiooniperioodi pikkus (samuti väljakülvatud rakkude arv ning vajaduse korral teave ümberkülvide ja söötmevahetusrežiimi kohta);

— selektiivaine identimisandmed ja kontsentratsioon;

— katsete nõuetekohasuse kriteeriumid;

— eluvõimeliste ja muteerunud rakkude loendamiseks kasutatud meetodid;

— tsütotoksilisuse mõõtmiseks kasutatud meetodid;

— muu täiendav asjakohane teave tsütotoksilisuse ja kasutatud meetodi kohta;

— väljakülvamisele järgneva inkubeerimise kestus;

— kriteeriumid, mille alusel uuringutulemused loetakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks;

— pH, osmolaalsuse ja sademe määramiseks kasutatud meetodid.

Tulemused:

— töödeldud rakkude arv ja ümberkülvatud rakkude arv igas kultuuris;

— tsütotoksilisuse andmed ja vajaduse korral muud tähelepanekud;

— sadenemise ilmingud ja nende täheldamise aeg;

— selektiivainega ja selektiivaineta söötmesse külvatud rakkude arv;

— kolooniate arv selektiivaineta söötmes ja resistentsete kolooniate arv selektiivainega söötmes ning vastav muteerumissagedus;

— võimaluse korral andmed kontsentratsioonist sõltuvuse kohta;

— andmed paralleelsete negatiivsete (lahustiga) kontrollide ja positiivsete kontrollide kohta (kontsentratsioonid ja lahustid);

— negatiivsete (lahustiga) kontrollide ja positiivsete kontrollidega varem saadud andmed, sealhulgas väärtusevahemikud, keskväärtused, standardhälbed ja usaldusvahemikud (nt usaldusnivool 95 %), samuti andmepunktide arv;

— statistilise analüüsi tulemused (iga kultuuri kohta eraldi ja vajaduse korral paralleelkultuuride koondandmed) ja vajaduse korral p-väärtused.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 234. OECD, Pariis.

(2) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J., ja Tindall, K. R. (toim.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

▼**M8**

(3) Chu, E. H. Y., ja Malling, H. V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61: 1306–1312.

(4) Moore, M. M., Harrington-Brock, K., Doerr, C. L., ja Dearfield, K. L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagenesis* 4: 394–403.

(5) Aaron, C. S., ja Stankowski, L. F. Jr. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutat. Res.* 223: 121–128.

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, L., Theiss, J., ja Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutat. Res.* 312: 235–239.

(7) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H., ja Wasson, J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutat. Res.* 196, 17–36.

(8) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J., ja Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutat. Res*. 257: 147–204.

(9) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., ja Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutat. Res.* 268: 297–305.

(10) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen.* 8: 789–886.

(11) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I., ja Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.* 49: 439–452.

(12) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., ja Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium. *Mutat. Res*. 634: 177–183.

(13) Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., ja Müller, L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutat. Res.* 584: 1–256.

(14) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr., ja Yang, L. L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutat. Res.* 189: 135–141.

(15) Liber, H. L., Yandell, D. W., ja Little, J. B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutat. Res.* 216: 9–17.

(16) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R., ja Hsie, A. W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutat. Res.* 160: 133–147.

▼**M8**

(17) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B., ja Asquith, J. C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Väljaandes: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press. Lk 66–101.

(18) Hsie, A. W., Casciano, D. A., Couch, D. B., Krahn, D. F., O'Neill, J. P., ja Whitfield, B. L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 86: 193–214.

(19) Li, A. P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures. *Mutat. Res.* 85: 165–175.

(20) Tindall, K. R., Stankowski, L. F. Jr., Machanoff, R., ja Hsie, A. W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells. *Mol. Cell. Biol.* 4: 1411–1415.

(21) Hsie, A. W., Recio, L., Katz, D. S., Lee, C. Q., Wagner, M., ja Schenley, R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge, E., Moore, M., Clements, J., Donovan, M. O., Honma, M., Kohara, A., Van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M. J., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Kim, J., Sutter, A., ja Kirkland, D. J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Poole-liolev käsikiri.)

(23) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., ja Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *Altern. Lab. Anim.* 33: 261–287.

(24) Rosen, M. P., San, R.,H.,C., ja Stich, H. F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures. *Cancer Lett.* 8: 299–305.

(25) Natarajan, A. T., Tates, A. D, Van Buul, P. P. W., Meijers, M., ja de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro* – I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutat. Res.* 37: 83–90.

(26) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N., ja Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutat. Res.* 46: 365–373.

(27) Ames, B. N., McCann, J., ja Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutat. Res.* 31: 347–364.

(28) Maron, D. M., ja Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutat. Res.* 113: 173–215.

(29) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., ja Wolf, R. C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis* 7: 175–177.

(30) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., ja Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Väljaandes: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R., ja Philpot, R. M. (toim.), Elsevier, North-Holland. Lk 85–88.

▼**M8**

(31) Ong, T.-M., Mukhtar, M., Wolf, C. R., ja Zeiger, E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 4: 55–65.

(32) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R., ja Galloway, S. M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9. *Environ. Mol. Mutagen.* 28: 51–59.

(33) UNEP (2001). Püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon. Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni Keskkonnaprogramm (UNEP). Kättesaadav aadressil [http://www.pops.int.html].

(34) Tan, E.-L., ja Hsie, A. W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. *Mutat. Res.* 84: 147–156.

(35) O'Neill, J. P., Machanoff, R., San Sebastian, J. R., ja Hsie, A. W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mutagen.* 4: 7–18.

(36) Li, A. P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation.* 6: 539–544.

(37) Krahn, D. F., Barsky, F. C., ja McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Väljaandes: Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R. R., Costa, D. L., ja Schaich, K. M. (toim.), New York, Plenum. Lk 91–103.

(38) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., ja Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.* 5: 795–801.

(39) OECD (2014). Dokument, millega toetatakse OECD katsejuhendite programmi riiklike koordinaatorite töörühma otsust rakendada imetajarakkudega tehtavate *in vitro* genotoksilisuse katsete puhul (katsejuhendid nr 473, 476 ja 487) suurima kontsentratsiooni valimise muudetud kriteeriume. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist.

(40) Brookmire, L., Chen, J. J., ja Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 54: 36–43.

(41) USA Keskkonnakaitseameti kemikaaliohutuse ja reostuse ennetamise büroo (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances.

(42) USA Toidu- ja Ravimiamet (2012). International Conference on Harmonisation; Guidance on S2 (R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Kättesaadav aadressil [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill, J. P., ja Hsie, A. W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system). *Mutat. Res.* 59: 109–118.

(44) Chiewchanwit, T., Ma, H., El Zein, R., Hallberg, L., ja Au, W. W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutat. Res.* 1335(2): 121–128.

▼**M8**

(45) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., ja Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutat. Res.* 723: 87–90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the OECD Test Guidelines on Genotoxicity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 199. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(47) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O., ja Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Väljaandes: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge. Lk 141–154.

(48) Fleiss, J. L., Levin, B., ja Paik, M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions. Kolmas väljaanne. John Wiley & Sons, New York.

▼**M8**

1. liide

MÕISTED

Aluspaarivahetust põhjustav mutageen: kemikaal, mis kutsub esile aluspaari vahetuse DNAs.

Fenotüübi avaldumise aeg: töötlusele järgnev aeg, mille vältel geneetiline muutus kinnistub genoomis ja mis tahes varem esinenud geeniproduktide sisaldus väheneb nii palju, et asjaomane fenotüübiline tunnus muutub.

Genotoksilisus: üldmõiste, mis hõlmab DNA ja kromosoomide mis tahes liiki kahjustusi, sealhulgas DNA-ahela katkemisi, adukte, ümberkorraldusi, mutatsioone, kromosoomiaberratsioone ja aneuploidsust. Genotoksiline mõju ei väljendu alati mutatsiooni või püsiva kromosoomikahjustusena.

HAT-sööde: sööde, mis sisaldab hüpoksantiini, aminopteriini ja tümidiini ning mida kasutatakse *Hprt*-mutantide selekteerimiseks.

Kemikaal: aine või segu.

Kloonimistõhusus: väikesel tihedusel välja külvatud rakkude hulgas esinevate selliste rakkude protsentuaalne osakaal, mis on võimelised moodustama loendatava koloonia.

Kontsentratsioon: tähistab uuritava kemikaali lõppkontsentratsiooni söötmes.

Lahustiga kontroll: üldmõiste, millega tähistatakse kontrollkultuuri, kuhu on lisatud üksnes uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahustit.

Maksafraktsioon S9: maksahomogenaadi supernatant, mis on saadud pärast tsentrifuugimist 9 000 *g* juures, st maksa toorekstrakt.

Mitootiline rekombinatsioon: mitoosi ajal homoloogsete kromatiidide vahel toimuv rekombinatsioon, millega võib kaasneda DNA kahe ahela katkemine või heterosügootsuse kadu.

MPA-sööde: sööde, mis sisaldab ksantiini, adeniini, tümidiini, aminopteriini ja mükofenoolhapet ning mida kasutatakse *xprt*-mutantide selekteerimiseks.

Mutageensus: omadus, mis põhjustab pärilikke muutusi geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomiaberratsioonid).

Muteerumissagedus: täheldatud mutantsete kolooniate arvu ja selektiivsöötmesse külvatud rakkude arvu suhe pärast selekteerimisaegse kloonimistõhususe (või elulemuse) suhtes korrigeerimist.

Päripidine mutatsioon: mutatsioon, mille puhul algne geen võtab mutantse vormi ja mille tulemusena muutub või kaob asjaomase kodeeritud valgu ensümaatiline aktiivsus või muu funktsioon.

Raaminihet põhjustav mutageen: kemikaal, mille mõjul lisatakse DNA molekuli või eemaldatakse sealt üks või mitu aluspaari.

S9 segu: maksafraktsiooni S9 ja metaboolsete ensüümide aktiivsuse tagamiseks vajalike kofaktorite segu.

▼**M8**

Suhteline elulemus: näitaja, mille kaudu väljendatakse töötlusest tulenevat tsütotoksilisust. Suhteline elulemus on vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusus, kohandatuna rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise käigus ja võrrelduna kloonimistõhususega negatiivsete kontrollide puhul, mille elulemuseks loetakse 100 %.

Tsütotoksilisus: käesoleva katsemeetodi kohaste katsete puhul on tsütotoksilisus määratletud kui töödeldud rakkude suhtelise elulemuse vähenemine negatiivse kontrolliga võrreldes (vt asjaomane konkreetne punkt).

Töötlemata kontroll: kultuur, mida ei ole töödeldud (st ei uuritava kemikaali ega lahustiga), kuid mida käideldakse samal viisil kui uuritava kemikaaliga töödeldud kultuure ning nendega samaaegselt.

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega kemikaal, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

▼M8

2. liide

VALEMID TSÜTOTOKSILISUSE JA MUTEERUMISSAGEDUSE HINDAMISEKS

Tsütotoksilisuse hindamiseks kasutatakse suhtelist elulemust, mis on määratletud kui vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusus, kohandatuna rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise käigus ja võrreldуna kohandatud kloonimistõhususega negatiivsete kontrollide puhul, mille elulemuseks loetakse 100 % (suhtelise elulemuse valem on esitatud allpool).

Uuritava kemikaaliga töödeldud kultuuri kohandatud kloonimistõhusus arvutatakse järgmiselt:

$$\text{kohandatud kloonimistõhusus} = \frac{\text{rakkude arv pärast töötlemist}}{\text{rakkude arv enne töötlemist}}$$

Uuritava kemikaaliga töödeldud kultuuri suhteline elulemus arvutatakse järgmiselt:

$$\text{suhteline elulemus} = \frac{\text{kohandatud kloonimistõhusus töödeldud kultuuris}}{\text{kohandatud kloonimistõhusus lahustiga kontrollis}} \times 100$$

Muteerumissagedus on mutantsete kolooniate kloonimistõhusus selektiivsöötmes, jagatuna sama kultuuri puhul mõõdetud selekteerimisaegse kloonimistõhususega selektiivaineta söötmes.

$$\text{Muteerumissagedus} = \frac{\text{mutantsete kolooniate kloonimistõhusus selektiivsöötmes}}{\text{kloommistõhususega selektiivaineta söötmes}}$$

Kui kloonimistõhususe hindamiseks kasutatakse tasse, siis:

kloonimistõhusus = kolooniate arv / välja külvatud rakkude arv.

Kui kloonimistõhususe hindamiseks kasutatakse mikrotiiterplaate, siis iseloomustab kolooniate arvu mikrotiiterplaadi kannu kohta Poissoni jaotus.

Kloonimistõhusus = – lnP(0) / välja külvatud rakkude arv kannu kohta,

kus – lnP(0) on tühjade kannude tõenäoline arv külvamiseks kasutatud kannude hulgas ning on kirjeldatav valemiga

lnP(0) = – ln (tühjade kannude arv / külvamiseks kasutatud kannude arv).

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. **IMETAJARAKU TRANSFORMATSIOONITESTID *IN VITRO***

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Imetajarakukultuure on võimalik *in vitro* kasutada keemiliste mutageenide poolt indutseeritud fenotüübiliste muutuste avastamiseks. Neid mutageene seostatakse maliigse transformatsiooni tekkega *in vivo*. Laialt kasutatavateks rakkudeks on $C_3H_{10}T_{1/2}$, 3T3, SHE ja Fischeri roti rakuliinid. Testid põhinevad rakumorfoloogia muutuste, fookuse moodustumise või agaroosgeelidel rakkude pesastumise muutuste avastamisel. Harvem tehakse uuringuid, mis avastavad kartsinogeensetele kemikaalidele eksponeeritud rakkudel teisi morfoloogilisi või füsioloogilisi muutuseid. Ükski *in vitro* testi tulemusnäitaja ei ole kinnitanud ühegi mehhanismi konkreetset süstemaatilist seost kasvajatega. Osad testsüsteemid on võimelised kindlaks tegema kasvajate promootoreid. Uuritavate ainete tsütotoksilisuse astet saab määrata, kui mõõta aine toimet pesasid moodustavatele ühikutele (kloonide produktsiooni efektiivsusele) ja rakukultuuride kasvukiirusele. Tsütotoksilisuse määramine on oluline tõestamaks, et testitav kemikaal avaldab toksilist toimet rakkudele, vaatamata sellele, et rakkude maliigse transformatsiooni sagedust ei ole alati võimalik mõõta. Põhjuseks on osades katsetes kasutatav pikem inkubatsiooniaeg ja/või ümber külvamine teisele alusele.

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. UURINGUMEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

R a k u d

Läbiviidavast transformatsioonitestist sõltuvalt on võimalik kasutada erinevaid rakuliine või tüvirakke. Katse tegija peab olema kindel, et testis kasutatavad rakud teevad läbi vajaliku fenotüüpse muutuse pärast kokkupuudet tuntud kartsinogeenidega. Samuti peab katse tegija tagama optimaalsed laboritingimused ning dokumenteeritud tõestuse, et uuring on kehtiv ja usaldusväärne.

K e s k k o n d

Transformatsiooni analüüsi tegemise keskkond ja katsetingimused peavad vastama vajadustele.

▼B

Uuritav aine

Uuritavad ained võib valmistada kultiveerimiskeskkonnas või lahustada või suspendeerida vastavates lahustis enne rakkude töötlemist. Lahusti lõppkontsentratsioon kultiveerimiskeskkonnas ei tohi mõjutada rakkude elulemust ega kasvukiirust.

Metaboolne aktivatsioon

Rakud peaksid olema eksponeeritud uuritavale ainele nii imetaja metaboolse aktivatsioonisüsteemi olemasolul kui ka selle puudumisel. Kui kasutatakse sisemist metaboolset aktiivsust omavaid rakutüüpe, peab tegema kindlaks, et rakkude metabolismi kiirus ja aktiivsuse iseloom vastavad tingimustele.

Katsetingimused

Positiivsete ja negatiivsete kontrollide kasutamine

Igas eksperimendis peab rakendama positiivset kontrolli rakkudele otsest mõju avaldava ühendiga ja ka ühendiga, mille toime avaldumiseks on vajalik metaboolse aktiivsuse olemasolu. Samuti on vajalik negatiivne kontroll (lahusti).

Positiivsete kontrollidena võib kasutada

— otsest toimet avaldavaid ühendeid:

  — etüülmetaansulfonaat;

  — β-propiolaktoon;

— kaudse toimega ühendeid:

  — 2-atsetüülaminofluoreen;

  — 4-dimetüülaminoasobenseen;

  — 7,12-dimetüülbensantratseen.

Kui võimalik, võib kasutada positiivse kontrollina uuritava ühendiga samasse keemilisse klassi kuuluvat ainet.

Kasutatavad kontsentratsioonid

Testis tuleb kasutada erineva uuritava aine kontsentratsiooniga lahuseid. Eesmärk on teha kindlaks kontsentratsioonist sõltuv toksiline efekt. Efekti olemasolul peaks kõrge uuritava aine kontsentratsiooniga lahuse toime järel rakkude elulemus langema ning väikese kontsentratsiooniga lahuse toime järel peaks rakkude elulemus olema ligikaudu sama, mis negatiivses kontroll-lahuses. Vees suhteliselt halvasti lahustuvaid aineid tuleks vastavate meetodite abil uurida lahustuvuse piirini. Täielikult veeslahustuvatele mittetoksilistele ainetele tuleb maksimaalne kontsentratsioonimäär valida vastavalt iga katse vajadusele.

▼B

Protseduur

Rakud peavad toksilisele substantsile olema eksponeeritud sobiva aja vältel, mis oleneb kasutatud testisüsteemist. Kui kokkupuuteaega pikendatakse, võib olla vajalik aine uuesti lisamine koos keskkonna vahetamisega (ja vajaduse korral värske, metaboolselt aktiivse lahuse lisamine). Piisava sisemise metaboolse aktiivsuseta rakud peavad uuritava ainega kokku puutuma nii sobiva metaboolset aktivatsiooni esilekutsuva süsteemi olemasolul kui ka puudumisel. Kokkupuuteaja lõppemisel pestakse rakud uuritavast ainest puhtaks ning külvatakse tingimustel, mis sobivad uuritava fenotüübi muutuse ilmnemiseks ja transformatsioonide arvu määramiseks. Kõik tulemused tõestatakse sõltumatu uuringuga.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada tabelis, mis võib olla erinev sõltuvalt kasutatud testist (kasutatud alusklaaside arv, positiivse tulemusega alusklaaside arv, mutatsioonidega rakkude arv). Võimaluse korral tuleks esitada mutatsioonisagedus muteerunud rakkude arvu ja eluvõimeliste rakkude arvu suhtena. Eluvõimelisuse määr ja kloonide produtseerimismäär esitatakse protsendina kontrollmäärast. Andmeid peab analüüsima sobivate statistiliste meetodite abil.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud rakuliin, rakukultuuride arv, rakukultuuride säilitusmeetodid;

— katsetingimused: uuritava aine kontsentratsioon, kasutatud lahusti, inkubatsiooni aeg, rakutihedus töötlemise ajal, imetaja metaboolset aktiivsust omava süsteemi tüüp, positiivsed ja negatiivsed kontrollid, jälgitud fenotüüpide kirjeldus, kasutatud selektiivsed ained (kui on asjakohane), annuste valiku põhimõte;

— eluvõimeliste ja mutantsete rakkude loendamise meetod;

— statistiline hindamine;

— tulemuste arutelu;

— järeldused.

3.2. HINNANG JA JÄRELDUSED

Vt üldtutvustus, B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus, B osa.

▼**M8**

B.22. **DOMINANTSE LETAALSE MÕJU KATSE NÄRILISTEGA**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 478 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaoluga seotud kaalutlusi. Käesolevas katsemeetodi muudetud versioonis kajastub selle meetodi kasutamisel saadud enam kui kolmekümne aasta pikkune kogemus, samuti annab see võimaluse lõimida või kombineerida seda meetodit muude mürgisuse hindamise meetoditega, mida kasutatakse näiteks arengu-, reproduktiiv- ja genotoksilisuse uurimiseks. Siiski on see katsemeetod sellega seotud piirangute ja suure arvu loomade kasutamise vajaduse tõttu ette nähtud kasutamiseks mitte peamise, vaid pigem täiendava katsemeetodina, mida võib kasutada üksnes juhul, kui regulatiivsetest nõuetest tulenevalt ei ole sellele alternatiivi. Mürgisuse hindamise meetodite kasutamine kombineerituna võimaldab säästa suure arvu mürgisuskatsetes kasutatavaid loomi. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

2. Dominantse letaalse mõju katse eesmärk on uurida, kas kemikaal põhjustab mutatsioone, mille tagajärjeks on kromosoomiaberratsioonid idurakkudes. Peale selle on kõnealune katse oluline genotoksilisuse hindamiseks, sest ehkki *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA reparatsiooni protsessidega seotud tegurid võivad liigiti varieeruda, on need aktiivsed ja aitavad kaasa vastusreaktsiooni kujunemisele. Dominantse letaalse mutatsiooni mõju ilmnemine pärast uuritava kemikaaliga kokkupuudet osutab asjaolule, et kemikaal on mõjutanud katselooma reproduktiivkudet.

3. Dominantne letaalne mutatsioon põhjustab embrüo või loote surma. Dominantse letaalse mutatsiooni mõju ilmnemine pärast uuritava kemikaaliga kokkupuudet osutab asjaolule, et kemikaal on mõjutanud katselooma idurakke.

4. Dominantse letaalse mõju katse on kasulik *in vivo* somaatilistel lõppnäitajatel põhinevate katsete positiivsete tulemuste kinnitamiseks ning selle lõppnäitaja võimaldab asjakohaselt hinnata ohtu inimesele ja sugurakkude kaudu geneetiliste haiguste edasikandumise riski. Ent kuna see katse nõuab suure arvu loomade kasutamist ja on töömahukas, on selle läbiviimine väga kulukas ja aeganõudev. Kuna spontaansete dominantsete letaalsete mutatsioonide tekkesagedus on küllalt suur, on meetodi tundlikkus muteerumissageduse väikese tõusu tuvastamisel üldjuhul piiratud.

5. Põhimõistete määratlused on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

6. Katse viiakse kõige sagedamini läbi hiirtega (2, 3, 4), kuid mõnel juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud, võib olla asjakohane kasutada mõnda muud liiki, näiteks rotte (5, 6, 7, 8). Dominantset letaalset mõju põhjustavad üldjuhul suured kromosoomiaberratsioonid (struktuursed ja arvulised muutused) (9, 10, 11), ent ei saa välistada ka geenimutatsioone. Dominantne

▼M8

letaalne mutatsioon on mutatsioon, mis esineb juba idurakus või kinnistub pärast viljastumist varajases embrüostaadiumis ja mis ei põhjusta gameedi talitlushäireid, kuid on viljastatud munarakule või arenevale embrüole letaalne.

7. Iga isaslooma paaritatakse sobivate ajavahemike järel järgemööda varem paaritumata emasloomadega. Töötlemisjärgsete paaritamiste arv sõltub dominantse letaalse mõju katse lõppeesmärgist (punkt 23) ja peaks võimaldama tagada, et dominantset letaalset mõju hinnatakse isaslooma idurakkude küpsemise kõikide etappide lõikes (12).

8. Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav kemikaal või selle metaboliit/metaboliidid ei jõua munandisse, ei ole käesoleva katsemeetodi kasutamine asjakohane.

KATSE PÕHIMÕTE

9. Üldpõhimõtte kohaselt viiakse isasloomad pärast sobiva kokkupuuteviisi valimist uuritava kemikaaliga kokkupuutesse ning neid paaritatakse varem paaritumata töötlemata emasloomadega. Teatava intervalliga järjestikuste paaritamiste teel on võimalik vaadelda eri tüüpi idurakke. Paaritamisele järgneva sobiva ajavahemiku möödudes surmatakse emasloomad humaanselt ning uuritakse nende emakat, et teha kindlaks pesastunud embrüote ning elus ja surnud embrüote arv. Uuritava kemikaali dominantse letaalse mõju tuvastamiseks võrreldakse pesastunud elus embrüote arvu emaslooma kohta kemikaaliga töödeldud rühmas ja kandeainega/lahustiga töödeldud kontrollide rühmas. Pesastunud surnud embrüote arvu suurenemine emaslooma kohta kemikaaliga töödeldud rühmas kontrollrühmaga võrrelduna osutab uuritavast kemikaalist põhjustatud pesastumisjärgsele embrüote kaole. Pesastumisjärgse embrüote kao arvutamiseks võrreldakse pesastunud surnud embrüote arvu ja pesastunud embrüote üldarvu suhet kemikaaliga töödeldud rühmas ja kontrollrühmas. Pesastumiseelse embrüote kao hindamiseks võib lahutada kollakehade arvust pesastunud embrüote üldarvu või võrrelda pesastunud embrüote üldarvu emaslooma kohta kemikaaliga töödeldud rühmas ja kontrollrühmas.

LABORI PÄDEVUSE TÕENDAMINE

10. Käesoleva meetodi kasutamise pädevuse kinnitamiseks tuleks tõendada võimekust reprodutseerida dominantsete letaalsete mutatsioonide esinemissageduse kohta avaldatud tulemusi (nt allikad 13, 14, 15, 16, 17, 18) nii positiivse kontrollina kasutatavate ainete, näiteks tabelis 1 loetletud ainete (sealhulgas nõrga toime) puhul kui ka kandeainega töödeldud kontrollide puhul, samuti peaks negatiivsete kontrollide puhul täheldatud sagedus jääma vastuvõetavasse andmevahemikku (vt viited eespool) või laboris kontrollidega varem saadud tulemuste jaotusvahemikku, kui sellised tulemused on olemas.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Loomaliigi valimine

11. Tuleks kasutada tavapäraste laboriliinide terveid suguküpseid loomi. Tavaliselt kasutatakse hiiri, ent võivad sobida ka rotid. Võib kasutada ka mis tahes muud sobivat imetajaliiki, kui katseprotokollis esitatakse sellekohane teaduslik põhjendus.

▼M8

Loomade pidamis- ja söötmistingimused

12. Näriliste puhul peaks loomapidamisruumi temperatuur olema 22 °C (± 3 °C). Suhteline niiskus peaks olema vähemalt 40 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, ideaaljuhul aga 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärast laborisööta ja piiramatus koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Näriliste pidamisel tuleks enne töötlemist ja paaritamist kasutada väikesi samasooliste loomade rühmi (maksimaalselt viis looma rühmas), kui ei ole põhjust eeldada või ei täheldata agressiivset käitumist; soovitatavalt tuleks kasutada sobiva mitmekesistatud keskkonnaga täispõhjaga puure. Loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud.

Loomade ettevalmistamine

13. Terved suguküpsed täiskasvanud isas- ja emasloomad jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Iga looma üheseks identimiseks kasutatakse humaanset minimaalselt invasiivset meetodit (nt rõngastamine, märgistamine, mikrokiibistamine või biomeetriline tuvastamine, kuid mitte kõrva sälkamine ega varba köndistamine) ning loomadel lastakse vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Tuleks ära hoida positiivse kontrollina kasutatava aine ja uuritava kemikaali vahelist ristsaastumist. Katse alguses peaksid loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle ± 20 % kummastki soost loomade keskmisest kehamassist.

Annuste ettevalmistamine

14. Tahke uuritav kemikaal tuleks enne loomadele annustamist lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või kandeaines või segada sööda või joogiveega. Vedelat uuritavat kemikaali võib annustada vahetult või seda enne annustamist lahjendada. Kui kokkupuude toimub sissehingamise teel, võib uuritavat kemikaali sõltuvalt selle füüsikalis-keemilistest omadustest manustada gaasina, auruna või tahke/vedela dispersse faasiga aerosoolina. Tuleks kasutada uuritava kemikaali värsket valmistist, välja arvatud juhul, kui kemikaali püsivusandmetest nähtub säilitamise vastuvõetavus ja on määratletud asjakohased säilitamistingimused.

Katsetingimused

Lahusti/kandeaine

15. Lahusti/kandeaine ei tohiks avaldada kasutatavate annuste puhul mürgist mõju ning ei tohiks olla kahtlust, et see võib uuritava kemikaaliga keemiliselt reageerida. Kui on valitud vähem tuntud lahusti/kandeaine, tuleks selle sobivuse tõendamiseks esitada selle kasutamist toetavad võrdlusandmed. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda veepõhise lahusti/kandeaine kasutamist. Tavaliselt kasutatavad lahustid/kandeained on näiteks vesi, füsioloogiline lahus, metüültselluloosi lahus, karboksümetüültselluloosi naatriumisoola lahus, oliiviõli ja maisiõli.

Positiivsed kontrollid

16. Katses tuleks alati paralleelselt kasutada positiivse kontrollina kasutatava ainega töödeldud loomi, välja arvatud juhul, kui labori pädevus katse läbiviimiseks on tõendatud ja katsemeetodit on lähiminevikus (nt viimase viie aasta jooksul) korrapäraselt kasutatud. Siiski ei ole vaja manustada positiivse kontrollina kasutatavat ainet loomadele samal viisil kui uuritavat kemikaali,

▼M8

samuti ei ole vaja võtta proove iga paaritumisintervalli järel. Positiivse kontrollina kasutatavad ained peaksid katses kasutatavates tingimustes teadaolevalt avaldama dominantset letaalset mõju. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda katserühma loomadega identsel viisil, välja arvatud ainega töötlemisel.

17. Positiivse kontrollina kasutatava aine annused tuleks valida nii, et positiivne dominantne letaalne mõju oleks nõrk või mõõdukas ja võimaldaks kriitiliselt hinnata meetodi töökindlust ja tundlikkust, kuid oleks samal ajal järjepidevalt tuvastatav. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited ja sobivad annused on esitatud tabelis 1.

Tabel 1

Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited

Aine [CASi nr] (viitenumber)	Toimivate annuste vahemik (mg/kg) (näriliseliigid)	Manustamisaeg (päevades)
Trietüleenmelamiin [51-18-3] (15)	0,25 (hiired)	1
Tsüklofosfamiid [50-18-0] (19)	50–150 (hiired)	5
Tsüklofosfamiid [50-18-0] (5)	25–100 (rotid)	1
Etüülmetaansulfonaat [62-50-0] (13)	100–300 (hiired)	5
Monomeerne akrüülamiid [79-06-1] (17)	50 (hiired)	5
Kloorambutsiil [305-03-3] (14)	25 (hiired)	1

Negatiivsed kontrollid

18. Igal proovivõtukorral tuleks kasutada negatiivse kontrollina loomi, kellele on manustatud ainult lahustit või kandeainet ja keda on muidu koheldud samal viisil kui katserühma loomi (20). Valitud lahusti/kandeaine dominantse letaalse ja muu kahjuliku mõju puudumist kinnitavate varasemate laboriandmete või avaldatud kontrollandmete puudumisel tuleks igal proovivõtukorral kasutada kontrollina ka loomi, kellele ei ole midagi manustatud, et tõendada kandeainega töödeldud kontrollrühma andmete vastuvõetavust.

KATSE KÄIK

Loomade arv

19. Iga isaslooma paaritatakse eelnevalt kindlaks määratud sobivate ajavahemike järel (nt kord nädalas; punktid 21 ja 23) järjestikku soovitatavalt ühe varem paaritumata emasloomaga. Eelnevalt peaks olema kindlaks tehtud, et isasloomade arv rühmas on piisav (hinnatuna koos igal paaritumisperioodil paaritunud emasloomade arvuga), et tagada vähemalt selline statistiline võimsus, mis on vajalik dominantse letaalse mõju esinemissageduse kahekordistumise tuvastamiseks (punkt 44).

20. Samuti tuleks statistilise võimsuse arvutustega eelnevalt kindlaks teha emasloomade vajalik arv igal paaritumisperioodil, et võimaldada miinimumeesmärgina dominantse letaalse mõju esinemissageduse kahekordistumise tuvastamist (st piisav tiinete emasloomade arv, et pesastunud embrüote üldarv oleks vähemalt 400) (20, 21, 22, 23) ning eeldatavalt vähemalt ühe pesastunud surnud embrüo esinemist analüüsiühiku kohta (st igas paaritamisrühmas iga annuse puhul) (24).

▼M8

Manustamisperiood ja paaritamisintervallid

21. Töötlemisjärgsete paaritamisintervallide arv sõltub manustamisrežiimist ja seejuures tuleks tagada, et dominantse letaalse mõju ilmnemist hinnatakse kõikides isaslooma idurakkude küpsemise etappides (12, 25). Ühekordsel töötlemisel, mis hõlmab kuni viie päevaannuse manustamist, tuleks pärast viimast manustamist viia ühenädalase vahega läbi 8 (hiirte puhul) või 10 (rottide puhul) paaritamist. Suurema arvu annuste manustamisel võib paaritamisintervallide arvu vähendada proportsionaalselt manustamisperioodi pikenemisega, ent jätkuvalt tuleks järgida eesmärki hinnata mõju kõikides spermatogeneesi etappides (näiteks piisab hiirte puhul spermatogeneesi igas etapis avalduva mõju hindamiseks 28 päeva pikkuse kokkupuuteperioodi järgselt neljast nädalase vahega toimuvast paaritamisest). Kõik manustamis- ja paaritamisrežiimid peavad olema teaduslikult põhjendatud.

22. Emasloomad peaksid jääma isasloomade juurde vähemalt üheks innatsükliks (nt hiirtel ja rottidel jääb ühe nädala sisse üks innatsükkel). Emasloomi, kes ei ole nädalapikkuse perioodi jooksul paaritunud, võib kasutada mõnel järgneval paaritamisperioodil. Emasloomad võib isasloomadest eraldada ka juba pärast paaritumist, mille tõendamiseks tehakse kindlaks seemnerakkude esinemine tupes või tupekorgi esinemine.

23. Kasutatav kokkupuute- ja paaritamisrežiim sõltub dominantse letaalse mõju katse lõppeesmärgist. Kui eesmärk on teha kindlaks, kas asjaomane kemikaal üldse põhjustab dominantseid letaalseid mutatsioone, on vastuvõetav sellise meetodi kasutamine, mille puhul kokkupuude hõlmab kogu spermatogeneesitsüklit (nt hiirte puhul 7 nädalat, 5–7 manustamiskorda nädalas) ja paaritamine toimub kokkupuute järgselt üks kord. Kui aga eesmärk on teha kindlaks, millist tüüpi idurakud on dominantse letaalse mõju suhtes tundlikud, siis on soovitatav kasutada nädalase intervalliga paaritamist pärast ühekordset või viie päeva pikkust kokkupuudet.

Annused

24. Kui annuste valimist hõlbustavate sobivate andmete puudumise tõttu tehakse annusevahemiku kindlakstegemiseks eeluuring, tuleks see läbi viia samas laboris, samast liigist, liinist ja soost loomadega ning sama manustamisrežiimi alusel kui põhiuuring (26). Eeluuringu eesmärk peaks olema teha kindlaks suurim talutav annus, mis on määratletud kui suurim annus, mida suudetakse uuringuperioodi jooksul taluda nii, et ei täheldata uuringu läbiviimist piirava mürgisuse nähte (näiteks ebatavalised reaktsioonid või käitumine, väike kehamassi vähenemine või tsütotoksilisus vereloomesüsteemi suhtes, mis aga ei põhjusta veel surma ega selliseid kannatusi, valu või stressi, mis nõuaksid loomade humaanset surmamist) (27).

25. Samuti ei tohi suurima talutava annuse puhul ilmneda kahjulikku mõju paaritumisedukusele (21).

26. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millel avaldub juba väikese mittemürgise annuse juures konkreetne bioloogiline aktiivsus (näiteks hormoonid ja mitogeenid) või mille puhul esineb toksikokineetiliste omadustega seotud küllastumine, ei pruugi annuste valimise kriteeriumid olla kohaldatavad ning neid kemikaale tuleks igal konkreetsel juhul eraldi hinnata.

27. Annusest sõltuvuse kohta teabe saamiseks tehtav täielik uuring peaks hõlmama negatiivse kontrolli rühma ja vähemalt kolme eri annust, mis erinevad üksteisest üldjuhul kaks korda, ent kõige rohkem neli korda. Kui uuritav kemikaal ei ole annusevahemiku kindlakstegemise uuringus või olemasolevate andmete põhjal mürgine, peaks suurim korraga manustatav annus olema 2 000 mg kehamassi kilogrammi kohta. Kui aga uuritav kemikaal põhjustab mürgisusnähte, tuleks suurima manustatava annusena kasutada suurimat talutavat annust ning kasutatav annusevahemik peaks soovitatavalt ulatuma suurimast annusest

▼M8

kuni annuseni, mille puhul täheldatav mürgisus on vähene või puudub. Mittemürgiste kemikaalide puhul on piirannus 14 päeva pikkuse või pikema manustamisperioodi puhul 1 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas ning 14 päevast lühema manustamisperioodi puhul 2 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas.

Annuste manustamine

28. Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese puhul eeldatavat kokkupuuteviisi. Seepärast võib vastavast põhjendusest lähtuvalt kasutada selliseid manustamisviise nagu manustamine söödaga, joogiveega, naha alla, veenisiseselt, paikselt, sissehingamise teel, suu kaudu (toitmissondiga) või implantaadiga. Igal juhul tuleks manustamisviis valida nii, et oleks tagatud sihtkoe/-kudede piisav kokkupuude uuritava kemikaaliga. Intraperitoneaalne süstimine ei ole tavaliselt soovitatav, kuna tegemist ei ole inimese puhul ette nähtud kokkupuuteviisiga, ning seda tuleks kasutada ainult juhul, kui on olemas sellekohane konkreetne teaduslik põhjendus. Kui uuritav kemikaal segatakse sööda või joogiveega, tuleks eriti üheainsa annuse manustamisel jälgida, et sööda ja vee tarbimise ning paaritumise vaheline ajavahemik oleks piisav, et võimaldada kemikaali mõju tuvastamist (punkt 31). Toitmissondi kaudu või süstimise teel korraga manustatav suurim vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. Tavaliselt ei tohiks see kogus olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, mida võib kasutada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema koguse kasutamist (kui see on loomade heaolu käsitlevate õigusaktide kohaselt lubatud) tuleks põhjendada. Katses kasutatava ruumala varieeruvuse minimeerimiseks tuleks muuta kemikaali kontsentratsiooni, et tagada kehamassi suhtes püsiva ruumala kasutamine kogu annusevahemiku lõikes.

Vaatlused

29. Katseloomadel tuleks teha kliinilisi vaatlusi ja registreerida kliinilised sümptomid vähemalt üks kord päevas, igal päeval soovitatavalt samal ajal, ning võtta seejuures arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju maksimaalse avaldumise ajavahemikku. Manustamisperioodil tuleks kõiki loomi haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks kontrollida vähemalt kaks korda päevas. Kõikide loomade kaal tuleks määrata uuringu alguses, korduvannustamise uuringu kestel vähemalt kord nädalas ning humaanse surmamise hetkel. Sööda tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist mõõta iga veevahetuse ajal ja vähemalt kord nädalas. Loomad, kellel täheldatakse liigse mittesurmava mürgisuse nähte, tuleks enne katse lõppu humaanselt surmata (27).

Kudede kogumine ja töötlemine

30. Emasloomad surmatakse humaanselt tiinuse teises pooles, hiirte puhul tiinuse 13. päeval ja rottide puhul tiinuse 14.–15. päeval. Dominantse letaalse mõju tuvastamiseks uuritakse loomade emakat, et teha kindaks pesastunud embrüote, elus ja surnud embrüote ning kollakehade arv.

31. Paljastatakse emakasarved ja munasarjad, et loendada kollakehad, ning looted eemaldatakse, loendatakse ja kaalutakse. Emakat tuleks hoolikalt uurida elus loodete varju jäävate resorbeerumiskohtade suhtes ja tagada, et kõik resorbeerumisjuhud saavad loendatud. Registreeritakse loodete suremus. Samuti registreeritakse edukalt tiinestunud emasloomade arv, pesastunud embrüote üldarv, pesastumiseelne kadu ja pesastumisjärgne suremus (sealhulgas varased ja hilised resorbeerumisjuhud). Peale selle võib nähtavaid

▼M8

looteid säilitada Bouini fikseerimislahuses vähemalt kaks nädalat ning seejärel uurida, kas neil esineb suuri väliseid väärarenguid (28), et saada lisateavet uuritava aine mõju kohta paljunemisvõimele ja arengule.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete töötlemine

32. Andmed tuleks esitada tabelina, kus on välja toodud paaritunud isasloomade arv, tiinete emasloomade arv ja tiinestumata emasloomade arv. Tuleks esitada eraldi iga paaritamise tulemused koos iga isasloomа ja emaslooma identimisandmetega. Iga emaslooma puhul tuleks esitada paaritamisintervall, isasloomadele manustatud annus ning elus ja surnud embrüote arv.

33. Pesastumisjärgse embrüote kao arvutamiseks võrreldakse pesastunud surnud embrüote arvu ja pesastunud embrüote üldarvu suhet kemikaaliga töödeldud rühmas ja lahustiga/kandeainega töödeldud kontrollrühmas.

34. Pesastumiseelse embrüote kao leidmiseks arvutatakse kollakehade arvu ja pesastunud embrüote arvu vahe või emaslooma kohta pesastunud embrüote keskmise arvu ja kontrollpaaritamisel saadud vastava näitaja erinevus. Pesastumiseelse embrüote kao hindamise korral tuleks tulemused registreerida.

35. Dominantse letaalsuse tegur leitakse järgmiselt: (pesastumisjärgsed surmajuhtumid / pesastunud embrüote üldarv emaslooma kohta) × 100.

36. Tuleks esitada andmed mürgisuse ja kliiniliste sümptomite kohta (vt punkt 29).

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

37. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid on järgmised:

— paralleelse negatiivse kontrolliga saadud tulemused on kooskõlas varasemaid negatiivse kontrolli andmeid käsitlevate avaldatud normidega, samuti laboris kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas (vt punktid 10 ja 18);

— paralleelsed positiivsed kontrollid kutsuvad esile reaktsioone, mis on kooskõlas varasemaid positiivsete kontrollide andmeid käsitlevate avaldatud normidega, samuti laboris positiivsete kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas, ning paralleelsete positiivsete kontrollidega saadud väärtused on statistiliselt oluliselt suuremad kui negatiivse kontrolliga saadud väärtused (vt punktid 17 ja 18);

— analüüsitud pesastunud embrüote üldarv ja eri annuste arv on piisav (punkt 20);

— suurima annuse valimise kriteeriumid on kooskõlas punktides 24 ja 27 kirjeldatud kriteeriumidega.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

38. Annusest sõltuvuse analüüsimiseks piisavate andmete saamiseks on vaja uurida vähemalt kolme rühma, kus on töötlemiseks kasutatud eri annuseid.

▼M8

39. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt positiivseks, kui:

— vähemalt ühe katses kasutatud annuse puhul täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,

— kõnealune suurenemine on sobiva testiga hindamisel vähemalt ühte tüüpi katsetingimustes (nt nädalase paaritamisintervalli puhul) annusest sõltuv ning

— mis tahes saadud tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotust (nt väljapoole Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).

Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama katseloomade idurakkudes dominantseid letaalseid mutatsioone. Kõige asjakohasemaid statistilisi meetodeid käsitlevad soovitused on esitatud punktis 44; kirjandusest võib leida teavet ka muude soovitatavate statistiliste lähenemisviiside kohta (20, 21, 22, 24, 29). Kasutatavate statistiliste testide puhul tuleks katseüksusena käsitada üksikisendit.

40. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt negatiivseks, kui:

— ühegi katses kasutatud annuse puhul ei täheldata saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,

— ühegi katsetingimuse puhul ei esine annusest sõltuvat väärtuse suurenemist ning

— kõik saadud tulemused jäävad vastuvõetavasse negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotusvahemikku (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).

Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama katseloomade idurakkudes dominantseid letaalseid mutatsioone.

41. Selgelt positiivset või negatiivset tulemust ei ole vaja üle kontrollida.

42. Juhul, kui tulemus ei ole selgelt negatiivne ega selgelt positiivne ning eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse – näiteks vaadeldava väärtuse väikese või piiripealse suurenemise – bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdihinnangut ja/või olemasolevatel katseandmetel põhinevat täiendavat analüüsi, näiteks kaaluda, kas positiivne tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste jaotust (30).

43. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavat analüüsi teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne; sel juhul loetakse tulemus ebaselgeks.

44. Kasutatavate statistiliste testide puhul tuleks katseüksusena käsitada isaslooma. Ehkki loendamisandmed (nt pesastunud embrüote arv emaslooma kohta) võivad olla Poissoni jaotusega ja/või osakaalu andmed (nt pesastunud surnud embrüote osakaal) binoomjaotusega, iseloomustab selliseid andmeid sageli siiski ülehajuvus (31). Sellest lähtuvalt tuleks statistilise analüüsi puhul esmalt kontrollida üle- või alahajuvuse esinemist selliste hajuvustestidega nagu Cochrani binoomjaotuse hajuvuse test (32) või Tarone'i C(α)-test binoomjaotuse ülehajuvuse tuvastamiseks (31, 33). Kui ei tuvastata kõrvalekallet binoomjaotusest, võib annusevahemiku lõikes täheldatavate osakaalumuutuste analüüsimiseks kasutada Cochrani-Armitage'i trenditesti (34) ja paariviisiliseks kontrollrühma andmetega võrdlemiseks Fisheri-Yatesi testi

▼M8

(35). Samamoodi võib juhul, kui ei tuvastata kõrvalekallet Poissoni jaotusest, kasutada loendamistulemustega seotud suundumuste tuvastamiseks Poissoni regressioonimudelit (36) ja Poissoni mudeli kontekstis paariviisiliseks kontrollrühma andmetega võrdlemiseks paariviisilisi kontraste (36). Kui tuvastatakse oluline üle- või alahajuvus, soovitatakse kasutada mitteparameetrilisi meetodeid (23, 31). Nende hulka kuuluvad sellised astakupõhised testid nagu Jonckheere'i-Terpstra trenditest (37) ja Manni-Whitney test (38) paariviisiliseks võrdlemiseks kandeainega/lahustiga töödeldud kontrollrühma andmetega, samuti permutatsiooni-, taasvalimis- ja *bootstrap*-testid suundumuste analüüsimiseks ja paariviisiliseks võrdlemiseks kontrollrühma andmetega (31, 39).

45. Dominantse letaalse mõju katse positiivsed tulemused on tõend uuritava kemikaali genotoksilisuse kohta katseliigi töödeldud isasloomа idurakkudes.

46. Saadud tulemuste bioloogilise olulisuse hindamisel võib juhinduda sellest, kas täheldatud väärtused jäävad laboris kontrollidega varem saadud tulemuste jaotusvahemikku või sellest väljapoole (40).

Katseprotokoll

47. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Kokkuvõte

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;

— uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;

— vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist;

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Uuritava kemikaali ettevalmistamine:

— kandeaine valimise põhjendus;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines, kui see on teada;

▼**M8**

— sööda või joogiveega või sissehingamise teel manustamiseks sobiva valmistise valmistamine;

— valmistise analüüsi tulemused (nt püsivus, homogeensus, nominaalne kontsentratsioon), kui need on olemas.

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;

— loomade ühese identimise meetod;

— lühiajaliste uuringute puhul: iga isaslooma kehamass katse alguses ja lõpus; ühest nädalast pikemate uuringute puhul: iga looma kehamass uuringu vältel ja sööda tarbimise andmed. Iga rühma kohta tuleks esitada kehamasside vahemik, keskväärtus ja standardhälve.

Katsetingimused:

— positiivse ja negatiivse (kandeainega/lahustiga) kontrolli andmed;

— annusevahemiku kindlakstegemise uuringu andmed;

— annuste valimise põhjendus;

— uuritava kemikaali ettevalmistamise üksikasjad;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— manustamisviisi valimise põhjendus;

— loomadel avalduva mürgisuse mõõtmise meetodid, sealhulgas andmed histopatoloogilise või hematoloogilise analüüsi kohta, kui seda on tehtud, samuti loomade vaatlemise ja kehamassi määramise sagedus;

— negatiivsete tulemuste korral meetodid selle kontrollimiseks, et uuritav kemikaal on jõudnud sihtkoesse või üldvereringesse;

— vajaduse korral tegelik annus (milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas), mis arvutatakse lähtuvalt sööda/joogivee tarbimisest ja selles sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsioonist (miljondikes);

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— puurikeskkonna mitmekesistamise üksikasjad;

— manustamis- ja proovivõturežiimide üksikasjalik kirjeldus ja nende valimise põhjendus;

— valutustamismeetod;

— humaanse surmamise meetod;

▼**M8**

— kudede eraldamise ja säilitamise meetodid;

— kõikide katsekomplektide ja reaktiivide päritolu ja partii number (vajaduse korral);

— loendamismeetodid dominantse letaalse mõju määramiseks;

— paaritamise ajakava;

— paaritumise kindlakstegemiseks kasutatud meetodid;

— humaanse surmamise aeg;

— dominantse letaalse mõju hindamise kriteeriumid, sealhulgas kollakehade, pesastunud embrüote, embrüote resorbeerumise, pesastumiseelse kao, pesastunud elus embrüote ja pesastunud surnud embrüote kindlakstegemiseks.

Tulemused:

— loomade seisund enne katset ja katseperioodi kestel, sealhulgas mürgisuse nähud;

— isasloomade kehamass manustamisperioodil ja paaritamisperioodil;

— paaritunud emasloomade arv;

— võimaluse korral andmed annusest sõltuvuse kohta;

— paralleelse negatiivse kontrolli andmed ja laboris negatiivse kontrolliga varem saadud andmed, sealhulgas tulemuste vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;

— paralleelse positiivse kontrolli andmed;

— tabeli kujul andmed iga tiinestunud emaslooma kohta: kollakehade arv tiinestunud emaslooma kohta; pesastunud embrüote arv tiinestunud emasloom a kohta; resorbeerunud embrüote ja enne pesastumist hävinud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta; pesastunud elus embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta; pesastunud surnud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta; loodete kehamass;

— eespool nimetatud andmed koondatud kujul iga paaritamisperioodi ja annuse kohta koos dominantse letaalse mõju avaldumissagedusega;

— teave statistilise analüüsi ja kasutatud meetodite kohta.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 238. OECD, Pariis.

(2) Bateman, A. J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse. Väljaandes: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Kilbey, B. J. *et al.* (toim.), Elsevier, Amsterdam. Lk 235–334.

(3) Ehling, U. H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., ja Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice Set up by the Work Group „Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics“. *Arch. Toxicol.* 39: 173–185.

▼**M8**

(4) Shelby, M. D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutat. Res.* 352: 159–167.

(5) Knudsen, I., Hansen, E. V., Meyer, O. A., ja Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutat. Res.* 48: 267–270.

(6) Anderson, D., Hughes, J. A., Edwards, A. J., ja Brinkworth, M. H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutat. Res.* 397: 77–74.

(7) Shively, C. A., White, D.,M., Blauch, J.,L., ja Tarka, S. M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20: 325–329.

(8) Rao, K. S., Cobel-Geard, S. R., Young, J. T., Hanley, T. R. Jr., Hayes, W. C., John, J. A., ja Miller, R. R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol*. 3: 80–85.

(9) Brewen, J. G., Payne, H. S., Jones, K. P., ja Preston, R. J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells. *Mutat. Res.* 33: 239–249.

(10) Marchetti, F., Bishop, J. B., Cosentino, L., Moore, D., II, ja Wyrobek, A. J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.* 70: 616–624.

(11) Marchetti, F., ja Wyrobek, A. J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res. C* 75: 112–129.

(12) Adler, I.-D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutat. Res.* 352: 169–172.

(13) Favor, J., ja Crenshaw, J. W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice. *Mutat. Res.* 53: 21–27.

(14) Generoso, W. M., Witt, K. L., Cain, K. T., Hughes, L., Cacheiro, N. L. A, Lockhart, A. M. C., ja Shelby, M. D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutat. Res.* 345: 167–180.

(15) Hastings, S. E., Huffman, K. W., ja Gallo, M. A. (1976). The Dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine. *Mutat. Res.* 40: 371–378.

(16) James, D. A., ja Smith, D. M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay. *Mutat. Res.* 99: 303–314.

(17) Shelby, M. D., Cain, K. T., Hughes, L. A., Braden, P. W., ja Generoso, W. M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutat. Res.* 173: 35–40.

▼**M8**

(18) Sudman, P. D., Rutledge, J. C., Bishop, J.,B., ja Generoso, W. M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice. *Mutat. Res.* 296: 143–156.

(19) Holstrom, L. M., Palmer, A. K., ja Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. Väljaandes: Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland, D. J., ja Fox, M. (toim.), Cambridge University Press. Lk 129–156.

(20) Adler, I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., ja Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis. *Mutat. Res.* 417: 19–30.

(21) Adler, I.-D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., ja Tanaka, N. (1994). Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutat. Res.* 312: 313–318.

(22) Generoso, W. M., ja Piegorsch, W. W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Väljaandes: Methods in Toxicology 3A. Lk 124–141.

(23) Haseman, J. K., ja Soares, E. R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutat. Res.* 41: 277–288.

(24) Whorton, E. B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality. *Teratogen. Carcin. Mut*. 1: 353–360.

(25) Anderson, D., Hodge, M. C. E., Palmer, S., ja Purchase, I. F. H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutat. Res.* 85: 417–429.

(26) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., ja Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis* 7: 313–319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(28) Barrow, M. V., ja Taylor, W. J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *J. Morphol.* 127: 291–306.

(29) Kirkland, D. J. (toim.) (1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., ja Thybaud, V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data“. *Mutat. Res.* 723: 87–90.

(31) Lockhart, A. C., Piegorsch, W. W., ja Bishop, J. B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutat. Res.* 272: 35–58.

(32) Cochran, W. G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics* 10: 417–451.

▼**M8**

(33) Tarone, R. E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika* 66: 585–590.

(34) Margolin, B. H. (1988). Test for Trend in Proportions. Väljaandes: Encyclopedia of Statistical Sciences, 9. köide. Kotz, S., ja Johnson, N. L. (toim.). Lk 334–336. John Wiley & Sons, New York.

(35) Cox, D. R. (1970). Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London.

(36) Neter, J. M., Kutner, H. C., Nachtsheim, J., ja Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models. Neljas väljaanne. 14. ja 17. peatükk. McGraw-Hill, Boston.

(37) Jonckheere, R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika* 41: 133–145.

(38) Conover, W. J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley & Sons, New York.

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Tööstus- ja Rakendusmatemaatika Ühing, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss, J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley & Sons, New York.

▼**M8**

1. liide

MÕISTED

Dominantne letaalne mutatsioon – idurakus tekkinud või pärast viljastamist kinnistunud mutatsioon, mis kutsub esile embrüo või loote surma.

Kemikaal – aine või segu.

Kollakeha – hormoone eritav moodustis munasarja pinnal, mis tekib munaraku vabastanud folliikuli asukohas. Kollakehade arv munasarjas vastab ovuleerunud munarakkude arvule.

Paaritamisintervall – kokkupuuteperioodi lõpu ja töödeldud isasloomade paaritamise vaheline ajavahemik. Selle intervalli muutmise teel on võimalik hinnata kemikaali mõju eri tüüpi idurakkudele. Hiirtel tehakse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ja 8 nädalat pärast kokkupuuteperioodi lõppu toimuva paaritamise teel kindlaks mõju vastavalt seemnerakkudele, kondenseerunud spermatiididele, ümaratele spermatiididele, pahhüteenis spermatotsüütidele, varajastele spermatotsüütidele, diferentseerunud spermatogoonidele, diferentseeruvatele spermatogoonidele ja spermatogoonide tüvirakkudele.

Pesastumiseelne kadu – kollakehade arvu ja pesastunud embrüote arvu vahe. Seda saab hinnata ka nii, et võrreldakse pesastunud embrüote üldarvu emaslooma kohta kemikaaliga töödeldud rühmas ja kontrollrühmas.

Pesastumisjärgne kadu – pesastunud surnud embrüote osakaal kemikaaliga töödeldud rühmas võrrelduna pesastunud surnud embrüote arvu ja pesastunud embrüote üldarvu suhtega kontrollrühmas.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

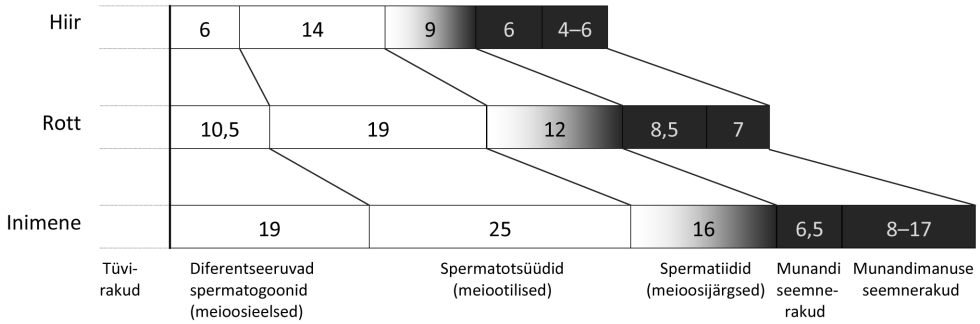
UVCB – tundmatu või muutuva koostisega kemikaal, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Viljakuskordaja – paaritunud tiinete emasloomade arvu ja paaritunud emasloomade arvu suhe.

▼**M8**

2. liide

IMETAJATE SPERMATOGENEESI ETAPID



Joonis 1. Hiire ja roti isaslooma ning mehe idurakkude arenguetappide kestuse (päevades) võrdlus; varjutusega perioodidel DNA reparatsiooni ei toimu

Eespool on esitatud hiire, roti ja inimese spermatogeneesi skemaatiline joonis (allikas: Adler, 1996). Diferentseerumata spermatogoonid hõlmavad A-tüüpi ühekaupa, A-tüüpi paarikaupa ja A-tüüpi reastunud spermatogoone (Hess ja Renato de Franca, 2008). Tõelisteks tüvirakkudeks peetakse A-tüüpi ühekaupa spermatogoone; seepärast peab ajavahemik uuritava kemikaali viimasest manustamisest kuni paaritamiseni olema vähemalt 49 päeva (hiirtel), et võimaldada hinnata tüvirakkudele avalduvat mõju.

Viited

Adler, I.-D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutat. Res.* 352: 169–172.

Hess, R. A., ja Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Väljaandes: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Cheng, C. Y. (toim.), Landes Bioscience ja Springer Science+Business Media. Lk 1–15.

▼**M8**

B.23. KROMOSOOMIABERRATSIOONIKATSE IMETAJATE SPERMATOGOONIDEGA

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 483 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaoluga seotud kaalutlusi. Käesolevas katsemeetodi muudetud versioonis kajastub selle meetodi kasutamisel saadud aastatepikkune kogemus, samuti annab see võimaluse lõimida või kombineerida seda meetodit muude mürgisuse või genotoksilisuse hindamise meetoditega. Mürgisuse hindamise meetodite kasutamine kombineerituna võimaldab vähendada mürgisuskatsetes kasutatavate loomade arvu. Käesolev katsemeetod kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

2. Imetajate spermatogoonidega tehtava *in vivo* kromosoomiaberratsioonikatse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis põhjustavad imetajate spermatogoonides struktuurseid kromosoomiaberratsioone (2, 3, 4). Peale selle on kõnealune katse oluline genotoksilisuse hindamiseks, sest ehkki *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA reparatsiooni protsessidega seotud tegurid võivad liigiti varieeruda, on need aktiivsed ja aitavad kaasa vastusreaktsiooni kujunemisele. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud kromosoomiarvu kõrvalekallete mõõtmiseks ning seda ei kasutata regulaarselt sel eesmärgil.

3. Käesoleva meetodiga mõõdetakse struktuurseid kromosoomiaberratsioone (nii kromosoomi- kui ka kromatiidiaberratsioone) jagunevates spermatogoonides ning seepärast võimaldab see eeldatavalt ennustada pärilike mutatsioonide tekkimist nimetatud idurakkudes.

4. Põhimõistete määratlused on esitatud liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

5. Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse tavaliselt närilisi, kuid mõnel teaduslikult põhjendatud juhul võib olla asjakohane kasutada mõnda muud liiki. Näriliste munandite tavapäraste tsütogeneetiliste preparaatide puhul analüüsitakse mitoosi metafaasi (spermatogoonides) ja meioosi metafaasi (spermatotsüütides). Mitoosi ja meioosi metafaas tuvastatakse kromosoomide morfoloogia alusel (4). Käesolev *in vivo* tsütogeneetiline meetod võimaldab teha kindlaks mitoosi ajal täheldatavaid struktuurseid kromosoomiaberratsioone spermatogoonides. Käesolevat meetodit ei kasutata muude sihtkudede puhul.

6. Spermatogoonides kromatiidiaberratsioonide tuvastamiseks tuleks uurida rakkude esimest töötlemisjärgset mitootilist jagunemist, kuna nimetatud aberratsioonidest saavad rakkude järgnevate jagunemiste käigus kromosoomiaberratsioonid. Lisateabe saamiseks analüüsitakse töödeldud spermatotsüütide kromosoome meioosi vältel diakineesi, I metafaasi ja II metafaasi etappides struktuursete kromosoomiaberratsioonide suhtes.

▼**M8**

7. Munandis esineb mitu spermatogoonide põlvkonda (5) ning kõnealuste eri tüüpi idurakkude tundlikkus kemikaalidega töötlemise suhtes võib olla erinev. Seega kajastavad tuvastatud aberratsioonid töödeldud spermatogoonide populatsioonidele avalduvat koondmõju. Munandipreparaatides on enamik mitoosis rakkudest B-tüüpi spermatogoonid, mille rakutsükli kestus on umbes 26 tundi (3).

8. Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav kemikaal või selle metaboliit/metaboliidid ei jõua munandisse, ei ole käesoleva katsemeetodi kasutamine asjakohane.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

9. Üldpõhimõtte kohaselt viiakse loomad pärast sobiva kokkupuuteviisi valimist uuritava kemikaaliga kokkupuutesse ning sobiva ajavahemiku möödumisel töötlemisest surmatakse loomad humaanselt. Enne surmamist manustatakse loomadele ainet, mis peatab rakkude jagunemise metafaasis (nt kolhitsiin või Colcemid®). Seejärel tehakse idurakkudest kromosoomipreparaadid ja värvitakse need ning metafaasis rakke analüüsitakse kromosoomiaberratsioonide suhtes.

LABORI PÄDEVUSE TÕENDAMINE

10. Käesoleva meetodi kasutamise pädevuse kinnitamiseks tuleks tõendada võimekust reprodutseerida positiivse kontrollina kasutatavate, näiteks tabelis 1 loetletud (sealhulgas nõrga toimega) ainetega saadud, spermatogoonides täheldatavate struktuursete kromosoomiaberratsioonide esinemissagedust käsitlevaid tulemusi, samuti peaks negatiivsete kontrollide puhul täheldatud sagedus jääma vastuvõetavasse kirjanduses avaldatud kontrollandmete jaotusvahemikku (nt allikad 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) või laboris kontrollidega varem saadud tulemuste jaotusvahemikku, kui sellised tulemused on olemas.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Loomaliigi valimine

11. Tuleks kasutada tavapäraste laboriliinide terveid noori täiskasvanud loomi. Tavaliselt kasutatakse isaseid hiiri; kui see on teaduslikult põhjendatud, võib siiski kasutada ka mõne muu sobiva imetajaliigi isasloomi, et käesolevat katsemeetodit oleks võimalik kasutada koos mõne muu katsemeetodiga. Teaduslik põhjendus näriliste asemel mõne muu liigi loomade kasutamise kohta tuleks esitada katseprotokollis.

Loomade pidamis- ja söötmistingimused

12. Näriliste puhul peaks loomapidamisruumi temperatuur olema 22 °C (± 3 °C). Suhteline niiskus peaks olema vähemalt 40 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, ideaaljuhul aga 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärast laborisööta ja piiramatus koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Näriliste pidamisel tuleks kasutada väikesi loomade rühmi (maksimaalselt viis looma puuri kohta), kui ei ole põhjust eeldada agressiivset käitumist; soovitatavalt tuleks kasutada sobiva mitmekesistatud keskkonnaga täispõhjaga puure. Loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud.

▼M8

Loomade ettevalmistamine

13. Tavaliselt kasutatakse terveid noori täiskasvanud (töötlemishetkeks 8–12 nädala vanuseid) loomi, kes jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Iga looma üheseks identimiseks kasutatakse humaanset minimaalselt invasiivset meetodit (nt rõngastamine, märgistamine, mikrokiibistamine või biomeetriline tuvastamine, kuid mitte kõrva sälkamine ega varba köndistamine) ning loomadel lastakse vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Tuleks ära hoida positiivse kontrollina kasutatava aine ja uuritava kemikaali vahelist ristsaastumist. Katse alguses peaksid loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle ± 20 %.

Annuste ettevalmistamine

14. Tahke uuritav kemikaal tuleks enne loomadele annustamist lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või kandeaines või segada sööda või joogiveega. Vedelat uuritavat kemikaali võib annustada vahetult või seda enne annustamist lahjendada. Kui kokkupuude toimub sissehingamise teel, võib uuritavat kemikaali sõltuvalt selle füüsikalis-keemilistest omadustest manustada gaasina, auruna või tahke/vedela dispersse faasiga aerosoolina. Tuleks kasutada uuritava kemikaali värsket valmistist, välja arvatud juhul, kui kemikaali püsivusandmetest nähtub säilitamise vastuvõetavus ja on määratletud asjakohased säilitamistingimused.

Katsetingimused – lahusti/kandeaine

15. Lahusti/kandeaine ei tohiks avaldada kasutatavate annuste puhul mürgist mõju ega olla võimeline uuritava kemikaaliga keemiliselt reageerima. Kui on valitud vähem tuntud lahusti/kandeaine, tuleks selle sobivuse tõendamiseks esitada selle kasutamist toetavad võrdlusandmed. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda veepõhise lahusti/kandeaine kasutamist. Tavaliselt kasutatavad lahustid/kandeained on näiteks vesi, füsioloogiline lahus, metüültselluloosi lahus, karboksümetüültselluloosi naatriumisoola lahus, oliiviõli ja maisiõli. Valitud ebatüüpilisest lahustist/kandeainest põhjustatud struktuursete kromosoomiaberratsioonide ja muu kahjuliku mõju puudumist kinnitavate varasemate laboriandmete või avaldatud kontrollandmete puudumisel tuleks teha eelkatse, et tõendada lahustiga/kandeainega töödeldud kontrollrühma andmete vastuvõetavust.

Positiivsed kontrollid

16. Katses tuleks alati paralleelselt kasutada positiivse kontrollina kasutatava ainega töödeldud loomi, välja arvatud juhul, kui labori pädevus katse läbiviimiseks on tõendatud ja katsemeetodit on lähiminevikus (nt viimase viie aasta jooksul) korrapäraselt kasutatud. Kui paralleelse positiivse kontrolli rühma ei kasutata, peaks iga katse hõlmama hindamiskontrolle (fikseeritud ja värvimata mikroskoobipreparaadid). Selleks võib uuringu raames hinnata asjakohaseid säilitatud võrdlusproove, mis on saadud positiivse kontrolliga tehtud eraldi katsest, mida viiakse uuringut tegevas laboris läbi korrapäraselt (nt iga 6–18 kuu järel), näiteks pädevuse tõendamise käigus ja seejärel regulaarselt vastavalt vajadusele.

17. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete puhul tuvastatav struktuursete kromosoomiaberratsioonidega rakkude esinemissagedus peaks järjepidevalt olema suurem kui vastav spontaanse esinemise sagedus. Positiivse kontrolli annused tuleks valida nii, et toime oleks selgelt tuvastatav, kuid ei võimaldaks hindajal teha kohe kindlaks kodeeritud proovide identiteeti. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited on esitatud tabelis 1.

▼M8

Tabel 1

Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited

Aine [CASi nr] (viitenumber)
Tsüklofosfamiid(monohüdraat) [CASi nr: 50-18-0 (CASi nr: 6055-19-2)] (9)
Tsükloheksüülamiin [CASi nr: 108-91-8] (7)
Mitomütsiin C [CASi nr: 50-07-7] (6)
Monomeerne akrüülamiid [CASi nr: 79-06-1] (10)
Trietüleenmelamiin [CASi nr: 51-18-3] (8)

Negatiivsed kontrollid

18. Igal proovivõtukorral tuleks kasutada negatiivse kontrollina loomi, kellele on manustatud ainult lahustit või kandeainet ja keda on muidu koheldud samal viisil kui katserühma loomi. Valitud lahustist/kandeainest põhjustatud kromosoomiaberratsioonide ja muu kahjuliku mõju puudumist kinnitavate varasemate laboriandmete või avaldatud kontrollandmete puudumisel tuleks igal proovivõtukorral kasutada kontrollina ka loomi, kellele ei ole midagi manustatud, et tõendada kandeainega töödeldud kontrollrühma andmete vastuvõetavust.

KATSE KÄIK

Loomade arv

19. Uuringu alguses tuleks kindlaks määrata selline rühmade suurus, et igas rühmas oleks vähemalt viis isaslooma. Sellist loomade arvu peetakse piisavaks, et tagada küllaldane statistiline võimsus (st üldjuhul võimekus tuvastada miinimumeesmärgina kromosoomiaberratsioonide esinemissageduse kahekordistumine 80-protsendilise tõenäosusega olulisusnivool 0,05, kui negatiivse kontrolli puhul täheldatav esinemissagedus on 1 % või suurem) (3, 11). Tüüpilisel juhul on suurim vajalik loomade arv katses, kus on kaks proovivõtuaega ning kolm eri annustele vastavat katserühma, paralleelse negatiivse kontrolli rühm ja positiivse kontrolli rühm (igas rühmas viis looma), 45 isendit.

Manustamiskava

20. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt üks kord (st ühekordse annusena); kui see on teaduslikult põhjendatud, võib kasutada ka mõnda muud annustamisrežiimi.

21. Rühmas, kus kemikaali kasutatakse suurimas annuses, võetakse manustamise järel proove kahel korral. Kuna uuritava(te) kemikaali(de) omastamiseks ja metaboliseerimiseks ning rakutsükli kineetikale mõju avaldumiseks vajalik aeg võib mõjutada kromosoomiaberratsioonide tuvastamise optimaalset aega, võetakse varasemad proovid umbes 24 tundi ja hilisemad proovid umbes 48 tundi pärast kemikaaliga töötlemist. Suurimast annusest erinevate annuste puhul tuleks proovid võtta varasemal proovivõtuajal ehk 24 tundi pärast töötlemist (see ajavahemik on lühem või sama pikk kui B-tüüpi spermatogoonide rakutsükli kestus ning esimese töötlemisjärgse metafaasi hindamise tõenäosus on seega optimaalne), välja arvatud juhul, kui mõne muu proovivõtuaja kasutamine on teadaolevalt asjakohasem ja põhjendatud.

22. Võib kasutada ka teistsuguseid proovivõtuaegu. Näiteks võib olla asjakohane kasutada S-faasist sõltumatu toimega kemikaalide puhul varasemat proovivõtuaega (st 24 tunnist lühemat ajavahemikku).

▼M8

23. Võib kasutada ka korduvannustamisel põhinevat režiimi, näiteks juhul, kui katse viiakse läbi koos katsega, milles hinnatakse mõnda muud lõppnäitajat ja kus kasutatakse 28 päeva pikkust manustamisperioodi (nt vastavalt katsemeetodile B.58); sel juhul on siiski vaja kasutada erinevate proovivõtuaegade puhul täiendavaid loomade rühmi. Sellest lähtuvalt tuleb sellise manustamiskava asjakohasust igal eraldi juhul teaduslikult põhjendada.

24. Enne humaanset surmamist süstitakse loomadele intraperitoneaalselt sobivas annuses kemikaali, mis peatab rakkude jagunemise metafaasis (nt Colcemid® või kolhitsiin). Seejärel võetakse loomadelt sobiva intervalliga proove. Hiirte ja rottide puhul on see intervall umbes 3–5 tundi.

Annused

25. Kui annuste valimist hõlbustavate sobivate andmete puudumise tõttu tehakse annusevahemiku kindlakstegemiseks eeluuring, tuleks see vastavalt annusevahemiku kindlakstegemise uuringu tegemist käsitlevatele soovitustele viia läbi samas laboris, samast liigist ja liinist loomadega ning sama manustamisrežiimi alusel kui põhiuuring (12). Eeluuringu eesmärk peaks olema teha kindlaks suurim talutav annus, mis on määratletud kui annus, mille puhul täheldatakse uuringuperioodi jooksul vähest mürgist mõju (näiteks ebatavalised reaktsioonid või käitumine, väike kehamassi vähenemine või tsütotoksilisus vereloomesüsteemi suhtes), kuid mis ei põhjusta surma ega selliseid kannatusi, valu või stressi, mis nõuaksid loomade humaanset surmamist (13).

26. Suurima annusena võib käsitada ka annust, mille puhul täheldatakse teatavaid mürgisuse ilminguid spermatogoonides (nt mitootiliste spermatogoonide ning meioosi esimeses või teises metafaasis olevate rakkude suhtarvu vähenemine). Kõnealune vähenemine ei tohiks olla suurem kui 50 %.

27. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millel avaldub juba väikese mittemürgise annuse juures konkreetne bioloogiline aktiivsus (näiteks hormoonid ja mitogeenid) või mille puhul esineb toksikokineetiliste omadustega seotud küllastumine, ei pruugi annuste valimise kriteeriumid olla kohaldatavad ning neid kemikaale tuleks igal konkreetsel juhul eraldi hinnata.

28. Annusest sõltuvuse kohta teabe saamiseks tehtav täielik uuring peaks hõlmama negatiivse kontrolli rühma (punkt 18) ja vähemalt kolme eri annust, mis erinevad üksteisest üldjuhul kaks korda, ent kõige rohkem neli korda. Kui uuritav kemikaal ei ole annusevahemiku kindlakstegemise uuringus või olemasolevate andmete põhjal mürgine, peaks suurim korraga manustatav annus olema 2 000 mg kehamassi kilogrammi kohta. Kui aga uuritav kemikaal põhjustab mürgisusnähte, tuleks suurima manustatava annusena kasutada suurimat talutavat annust ning kasutatav annusevahemik peaks soovitatavalt ulatuma suurimast annusest kuni annuseni, mille puhul täheldatav mürgisus on vähene või puudub. Kui mürgisust sihtkoe (st munandite) suhtes täheldatakse kõigi katses kasutatud annuste puhul, on soovitatav teha lisakatse, milles kasutatakse mittemürgiseid annuseid. Uuringutes, milles soovitakse kvantitatiivset annusest sõltuvust lähemalt iseloomustada, võib olla vaja kasutada täiendavaid annuserühmi. Teatavat liiki uuritavate kemikaalide (näiteks inimravimite) puhul, mille suhtes kohaldatakse erinõudeid, võivad asjaomased piirmäärad olla teistsugused. Kui uuritav kemikaal ei ole mürgine, tuleks kasutada piirannust ja kahte väiksemat annust (nagu on kirjeldatud eespool). Piirannus on 14 päeva pikkuse või pikema manustamisperioodi puhul 1 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas ning 14 päevast lühema manustamisperioodi puhul 2 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas.

▼M8

Annuste manustamine

29. Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese puhul eeldatavat kokkupuuteviisi. Seepärast võib vastavast põhjendusest lähtuvalt kasutada selliseid manustamisviise nagu manustamine söödaga, joogiveega, paikselt, naha alla, veenisiseselt, suu kaudu (toitmissondiga), sissehingamise teel või implantaadiga. Igal juhul tuleks manustamisviis valida nii, et oleks tagatud sihtkoe piisav kokkupuude uuritava kemikaaliga. Intraperitoneaalne süstimine ei ole tavaliselt soovitatav, kui see ei ole teaduslikult põhjendatud, kuna üldjuhul ei ole tegemist inimese puhul füsioloogiliselt asjakohase kokkupuuteviisiga. Kui uuritav kemikaal segatakse sööda või joogiveega, tuleks eriti üheainsa annuse manustamisel jälgida, et sööda ja vee tarbimise ning proovivõtmise vaheline ajavahemik oleks piisav, et võimaldada kemikaali mõju tuvastamist (vt punkt 33). Toitmissondi kaudu või süstimise teel korraga manustatav suurim vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. Tavaliselt ei tohiks see kogus olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, mida võib kasutada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema koguse kasutamist (kui see on loomade heaolu käsitlevate õigusaktide kohaselt lubatud) tuleks põhjendada. Katses kasutatava ruumala varieeruvuse minimeerimiseks tuleks muuta kemikaali kontsentratsiooni, et tagada kehamassi suhtes püsiva ruumala kasutamine kogu annusevahemiku lõikes.

Vaatlused

30. Katseloomadel tuleks teha kliinilisi vaatlusi ja registreerida kliinilised sümptomid vähemalt üks kord päevas, igal päeval soovitatavalt samal ajal, ning võtta seejuures arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju maksimaalse avaldumise ajavahemikku. Kõiki loomi tuleks haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks kontrollida vähemalt kaks korda päevas. Kõikide loomade kaal tuleks määrata uuringu alguses, korduvannustamise uuringu kestel vähemalt kord nädalas ning humaanse surmamise hetkel. Kui uuring kestab vähemalt ühe nädala, tuleks vähemalt kord nädalas mõõta sööda tarbimist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist mõõta iga veevahetuse ajal ja vähemalt kord nädalas. Loomad, kellel täheldatakse liigse mittesurmava mürgisuse nähte, tuleks enne katse lõppu humaanselt surmata (13).

Kromosoomipreparaatide valmistamine

31. Kohe pärast humaanset surmamist võetakse ühest või kummastki munandist idurakususpensioon, mis viiakse hüpotoonilisse lahusesse ja fikseeritakse väljatöötatud meetodite kohaselt (nt allikad 2, 14, 15). Seejärel kantakse rakud objektiklaasile ja värvitakse (16, 17). Kõik mikroskoobipreparaadid tuleks kodeerida, et nende identiteet ei oleks hindajale teada.

Analüüs

32. Iga looma puhul tuleks hinnata vähemalt 200 hästi väljendunud metafaasis rakku (3, 11). Kui laboris negatiivse kontrolli puhul varem täheldatud sagedus on < 1 %, tuleks statistilise võimsuse suurendamiseks hinnata üle 200 raku looma kohta (3). Tuleks kasutada tsentromeeri tuvastamist võimaldavaid värvimismeetodeid.

33. Kromosoomi- ja kromatiidiaberratsioonid tuleks registreerida eraldi ja liigitada need alatüübi alusel (katked, vahetused). Tuleks registreerida ka lüngad, kuid jätta need selle kindlakstegemisel, kas kemikaal põhjustab kromosoomiaberratsioonidega rakkude esinemissageduse olulist suurenemist, arvesse võtmata. Labori eeskirjadega tuleks tagada, et kromosoomiaberratsioone

▼M8

analüüsivad väljaõppinud hindajad. Lähtuvalt asjaolust, et mikroskoobipreparaadi valmistamise käigus puruneb sageli osa metafaasis olevatest rakkudest ning sellega kaasneb kromosoomide kadu, peaks tsentromeeride arv hinnatavates rakkudes olema vähemalt $2n \pm 2$, kus n on liigiomane haploidne kromosoomiarv.

34. Ehkki katse eesmärk on tuvastada struktuurseid kromosoomiaberratsioone, on oluline registreerida polüploidsete rakkude ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude täheldamisel ka nende esinemissagedus (vt punkt 44).

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete töötlemine

35. Andmed iga looma kohta tuleks esitada tabelina. Iga looma puhul tuleks hinnata struktuurse(te) kromosoomiaberratsiooni(de)ga rakkude arvu ja kromosoomiaberratsioonide arvu raku kohta. Alatüüpidesse liigitatud kromatiidi- ja kromosoomiaberratsioonid (katked, vahetused) tuleks loetleda eraldi ning esitada nende arv ja esinemissagedus katse- ja kontrollrühmades. Lüngad registreeritakse eraldi. Lünkade esinemissagedus küll esitatakse, kuid üldjuhul ei võeta seda struktuursete kromosoomiaberratsioonide üldsageduse analüüsimisel arvesse. Polüploidsete rakkude või endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude esinemisel esitatakse ka nende protsentuaalne osakaal.

36. Tuleks esitada andmed mürgisuse ja kliiniliste sümptomite kohta (vt punkt 30).

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

37. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid on järgmised:

— paralleelse negatiivse kontrolliga saadud tulemused on kooskõlas varasemaid negatiivse kontrolli andmeid käsitlevate avaldatud normidega, mille kohaselt on kromosoomiaberratsioonidega rakkude osakaal eeldatavalt > 0 % ja $\leq 1{,}5$ %, ning samuti laboris kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas (vt punktid 10 ja 18);

— paralleelsed positiivsed kontrollid kutsuvad esile reaktsioone, mis on kooskõlas varasemaid positiivsete kontrollide andmeid käsitlevate avaldatud normidega, samuti laboris positiivsete kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas, ning paralleelsete positiivsete kontrollidega saadud väärtused on statistiliselt oluliselt suuremad kui negatiivse kontrolliga saadud väärtused (vt punktid 17 ja 18);

— analüüsitud rakkude ja eri annuste arv on piisav (vt punktid 28 ja 32);

— suurima annuse valimise kriteeriumid on kooskõlas punktides 25 ja 26 kirjeldatud kriteeriumidega.

38. Kui vaadeldakse nii meioosi kui ka mitoosi, tuleks tsütotoksilisuse hindamiseks teha iga töödeldud looma ja negatiivse kontrolli looma puhul kindlaks mitootiliste spermatogoonide ja meioosi esimeses või teises metafaasis olevate rakkude suhtarv proovis, kus on kokku 100 jagunevat rakku. Kui vaadeldakse üksnes mitoosi, tuleks iga looma puhul teha vähemalt 1 000 raku põhjal kindlaks mitoosiindeks.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

39. Annusest sõltuvuse analüüsimiseks piisavate andmete saamiseks on vaja uurida vähemalt kolme rühma, kus on töötlemiseks kasutatud eri annuseid.

▼**M8**

40. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt positiivseks, kui:

— vähemalt ühe katses kasutatud annuse puhul täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,

— kõnealune suurenemine on vähemalt ühe proovivõtuaja puhul annusest sõltuv ning

— mis tahes saadud tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotust (nt väljapoole Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).

Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama katseloomade spermatogoonides kromosoomiaberratsioone. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud ka kirjanduses (11, 18). Kasutatavate statistiliste testide puhul tuleks katseüksusena käsitada üksikisendit.

41. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt negatiivseks, kui:

— ühegi katses kasutatud annuse puhul ei täheldata saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,

— ühegi katsetingimuse puhul ei esine annusest sõltuvat väärtuse suurenemist ning

— kõik saadud tulemused jäävad vastuvõetavasse negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotusvahemikku (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).

Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama katseloomade spermatogoonides kromosoomiaberratsioone. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud ka kirjanduses (11, 18). Negatiivse tulemuse korral ei ole välistatud võimalus, et kemikaal põhjustab kromosoomiaberratsioone mõnes uuringuga hõlmamata hilisemas arenguetapis või kutsub esile geenimutatsioone.

42. Selgelt positiivset või negatiivset tulemust ei ole vaja üle kontrollida.

43. Juhul, kui tulemus ei ole selgelt negatiivne ega selgelt positiivne ning eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse – näiteks vaadeldava väärtuse väikese või piiripealse suurenemise – bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdihinnangut ja/või olemasolevatel katseandmetel põhinevat täiendavat analüüsi, näiteks kaaluda, kas positiivne tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste jaotust (19).

44. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavat analüüsi teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne; sel juhul loetakse tulemus ebaselgeks.

45. Polüploidsete rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal on võimeline pärssima mitoosiprotsesse ja põhjustama kromosoomiarvu muutusi (20). Endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal on võimeline pärssima rakutsükli edenemist (21, 22) – see kromosoomiarvu muutusi põhjustav mehhanism erineb mitoosiprotsesside pärssimise mehhanismist (vt punkt 2). Seepärast tuleks polüploidsete rakkude ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude esinemissagedus registreerida eraldi.

▼**M8**

Katseprotokoll

46. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Kokkuvõte

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;

— uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;

— vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist;

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Uuritava kemikaali ettevalmistamine:

— kandeaine valimise põhjendus;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines;

— sööda või joogiveega või sissehingamise teel manustamiseks sobiva valmistise valmistamine;

— valmistise analüüsi tulemused (nt püsivus, homogeensus, nominaalne kontsentratsioon), kui need on olemas.

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin ja selle kasutamise põhjendus;

— loomade arv ja vanus;

— päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;

— loomade ühese identimise meetod;

— lühiajaliste uuringute puhul: iga looma kehamass katse alguses ja lõpus; ühest nädalast pikemate uuringute puhul: iga looma kehamass uuringu vältel ja sööda tarbimise andmed. Iga rühma kohta tuleks esitada kehamasside vahemik, keskväärtus ja standardhälve.

Katsetingimused:

— positiivse ja negatiivse (kandeainega/lahustiga) kontrolli andmed;

▼**M8**

— annusevahemiku kindlakstegemise uuringu andmed, kui need on olemas;

— annuste valimise põhjendus;

— manustamisviisi valimise põhjendus;

— uuritava kemikaali ettevalmistamise üksikasjad;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— surmamisaja valimise põhjendus;

— loomadel avalduva mürgisuse mõõtmise meetodid, sealhulgas andmed histopatoloogilise või hematoloogilise analüüsi kohta, kui seda on tehtud, samuti loomade vaatlemise ja kehamassi määramise sagedus;

— negatiivsete tulemuste korral meetodid selle kontrollimiseks, et uuritav kemikaal on jõudnud sihtkoesse või üldvereringesse;

— vajaduse korral tegelik annus (milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas), mis arvutatakse lähtuvalt sööda/joogivee tarbimisest ja selles sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsioonist (miljondikes);

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— manustamis- ja proovivõturežiimide üksikasjalik kirjeldus ja nende valimise põhjendus;

— humaanse surmamise meetod;

— valutustamismeetod (kui seda kasutati);

— kudede eraldamise meetodid;

— kemikaal, mida kasutati rakkude jagunemise peatamiseks metafaasis, selle kontsentratsioon ja manustamise kestus;

— mikroskoobipreparaadi valmistamise meetodid;

— aberratsioonide hindamise kriteeriumid;

— analüüsitud rakkude arv looma kohta;

— kriteeriumid uuringutulemuse liigitamiseks positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks.

Tulemused:

— loomade seisund enne katset ja katseperioodi kestel, sealhulgas mürgisuse nähud;

— kehamass ja organite kaal surmamishetkel (korduvmanustamise korral manustamisperioodi vältel mõõdetud kehamass);

— mürgisusnähud;

— mitoosiindeks;

— mitootiliste spermatogoonide ja meioosi esimeses või teises metafaasis olevate rakkude suhtarv või mõni muu tõend, et sihtkude on kemikaaliga kokku puutunud;

— aberratsioonitüübid ja aberratsioonide arv eraldi iga looma kohta;

— aberratsioonide üldarv rühma kohta ning vastavad keskväärtused ja standardhälbed;

▼M8

— aberratsioonidega rakkude arv rühma kohta ning vastavad keskväärtused ja standardhälbed;

— võimaluse korral andmed annusest sõltuvuse kohta;

— teave statistilise analüüsi ja kasutatud meetodite kohta;

— paralleelse negatiivse kontrolli andmed;

— negatiivse kontrolliga varem saadud andmed, sealhulgas väärtusevahemikud, keskväärtused, standardhälbed ja usaldusvahemikud usaldusnivool 95 % (kui need on olemas), või varasemad avaldatud negatiivse kontrolli andmed, mida kasutati katsetulemuste vastuvõetavuse hindamiseks;

— paralleelse positiivse kontrolli andmed;

— täheldatud muutused ploidsuses, sealhulgas polüploidsete ja/või endoreduplikatsiooniga rakkude esinemissagedus.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 238. OECD, Pariis.

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Väljaandes: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Venitt, S., ja Parry, J. M. (toim.), IRL Press, Oxford, Washington, D. C. Lk 275–306.

(3) Adler, I.-D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., ja Tanaka, N. (1994). Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutat. Res.* 312: 313–318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. *Mutat. Res.* 455: 167–189.

(5) Hess, R. A., ja Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Väljaandes: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Cheng, C. Y. (toim.), Landes Bioscience ja Springer Science+Business Media. Lk 1–15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C. *Mutat. Res*. 23(3): 368–379. Adler, I.-D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Väljaandes: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis. Ramel, C., Lambert, B., ja Magnusson, J. (toim.), Liss, New York. Lk. 477–484.

(7) Cattanach, B. M., ja Pollard, C. E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse. *Mutat. Res.* 12: 472–474.

(8) Cattanach, B. M., ja Williams, C. E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens. *Mutat. Res.* 13: 371–375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia. *Humangenetik* 29: 135–140.

▼**M8**

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice. *Mutat. Res.* 57(3): 313–324.

(11) Adler, I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., ja Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis. *Mutat. Res.* 417: 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., ja Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis* 7: 313–319.

(13) 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(14) Yamamoto, K., ja Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutat. Res.* 52: 207–209.

(15) Hsu, T. C., Elder, F., ja Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.* 1: 291–294.

(16) Evans, E. P., Breckon, G., ja Ford, C. E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenet. Cell Genet.* 3: 289–294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., ja Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays. Väljaandes: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. Lk 115–141.

(18) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., ja Savage, J. R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. Väljaandes: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part III. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. Lk 184–232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., ja Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutat. Res.* 723: 87–90.

(20) Warr, T. J., Parry, E. M., ja Parry, J. M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens. *Mutat. Res.* 287: 29–46.

(21) Huang, Y., Change, C., ja Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.* 43: 1362–1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutat. Res.* 119: 403–413.

▼M8

Liide

MÕISTED

Aneuploidsus – mis tahes kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidsus).

Genotoksilisus – üldmõiste, mis hõlmab DNA ja kromosoomide mis tahes liiki kahjustusi, sealhulgas katkeid, deletsioone, adukte, nukleotiidide modifikatsioone ja sidemete teket, ümberkorraldusi, mutatsioone, kromosoomiaberratsioone ja aneuploidsust. Genotoksiline mõju ei väljendu alati mutatsiooni või püsiva kromosoomikahjustusena.

Kemikaal – aine või segu.

Klastogeen – mis tahes kemikaal, mis põhjustab rakkude või organismide populatsioonis struktuurseid kromosoomiaberratsioone.

Kromatiidiaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub üksikkromatiidi katkemisena või kromatiidide katkemise ja omavahelise taasühinemisena.

Kromosoomiaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub mõlema kromatiidi katkemisena või katkemise ja taasühinemisena samas kohas.

Kromosoomiarvu kõrvalekalle – kasutatud loomadele omase tavapärase kromosoomiarvu muutus.

Kromosoomide varieeruvus – kromosoomide kuju ja suuruse varieeruvus (nt metatsentrilised, akrotsentrilised vm kromosoomid).

Lünk – akromaatiline kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja millega kaasneb kromatiidi struktuuri minimaalne muutus.

Mitoos – rakutuuma jagunemise protsess, mis tavaliselt jagatakse profaasiks, prometafaasiks, metafaasiks, anafaasiks ja telofaasiks.

Mitoosiindeks – suhtarv, mis saadakse metafaasis olevate rakkude arvu jagamisel vaatlusaluse rakupopulatsiooni rakkude üldarvuga; võimaldab hinnata paljunemismäära selles rakupopulatsioonis.

Mutageensus – omadus, mis põhjustab pärilikke muutusi geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomiaberratsioonid).

Polüploidsus – haploidse kromosoomiarvu (n) kordsus, v.a diploidsus (nt $3n$, $4n$ jne).

Struktuurne aberratsioon – raku jagunemise metafaasietapis mikroskoobi abil tuvastatav kromosoomistruktuuri muutus, mis väljendub deletsioonis või fragmentide vahetuses.

Tsentromeer – kromosoomi piirkon(na)d, mille külge kinnituvad raku jagunemise ajal kääviniidid, mis võimaldavad tütarkromosoomidel liikuda korrapäraselt tütarrakkude poolustele.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega kemikaal, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

▼M7

▼B

B.25. **HIIRE PÄRILIK TRANSLOKATSIOON**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

Hiire päriliku translokatsiooni test teeb kindlaks esimese põlvkonna järglastel kindlaks tehtud struktuursed ja arvulised muutused imetajate idurakkude kromosoomides. Kindlaks tehtud kromosomaalsed muutused on retsiprooksed translokatsioonid ja juhul kui kaasa on haaratud ka järglaskonna emasloomad, kantakse edasi X-kromosoomide kadu. Translokatsioonide kandjatel ja XO-emastel on vähenenud viljakus, mida kasutatakse F_1 järglaskonna selekteerimiseks tsütogeneetilise analüüsi jaoks. Täielikku steriilsust põhjustavad teatud kindlat tüüpi translokatsioonid (X-autosoomi ja c-t tüüp). Translokatsioone jälgitakse tsütogeneetiliselt meiootilistes rakkudes diakineesi I metafaasis isastel indiviididel, kas F_1 isastel või F_1 emaste isastel järglastel. XO-emased identifitseeritakse tsütogeneetiliselt ainult 39 kromosoomi olemasolu põhjal luuüdi mitoosides.

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. UURINGUMEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Testitavad kemikaalid lahustatakse isotoonilises soolalahuses. Kui ained on vees lahustumatud, siis lahustatakse või suspendeeritakse nad vastavates lahustites. Kasutatakse värskelt valmistatud testitavate ühendite lahuseid. Kui lahustit kasutatakse annustamise lihtsustamiseks, ei tohi sellel olla koostoimet testitava kemikaaliga, samuti ei tohi see mõjuda toksiliselt.

M a n u s t a m i s v i i s

Manustamisviisideks on tavaliselt suukaudselt sondi teel või intraperitoneaalne süstimine. Sobida võivad ka teised manustamisviisid.

K a t s e l o o m a d

Paarituste läbiviimise ja tsütoloogilise tõestamise lihtsustamiseks tehakse need katsed hiirtega. Spetsiifiliste hiireliinide kasutamine ei ole vajalik, kuid keskmine pesakonna suurus antud liini hiirtel peaks olema suurem kui kaheksa ja see peaks olema suhteliselt konstantne.

Katsesse valitakse terved suguküpsed loomad.

▼B

Loomade arv

Vajalik loomade arv sõltub spontaansete translokatsioonide sagedusest ja positiivse tulemuse saamiseks vajaliku induktsiooni minimaalsest tasemest.

Test põhineb tavaliselt F_1 järglaskonna isasloomade analüüsil. Ühes uuritavat ainet saavate hiirte grupis tuleb testida vähemalt 500 F_1 järglaskonna isast. Kui on kaasatud ka F_1 järglaskonna emased, siis tuleb testida 300 isas- ja 300 emaslooma.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

Kasutatavad peavad olema vastavad kontrollandmed, mis on saadud konkureerivate ja varem tehtud testide kontrollrühmade kohta. Kui on olemas aktsepteeritavad hiljuti samas laboris tehtud eksperimentide positiivsete kontrollide tulemused, siis võib kasutada neid andmeid ja jätta positiivsed kontrollid käesolevast testist välja.

Annused

Testitakse ühte, tavaliselt kõige suuremat annust, mis on seotud loomal minimaalsete toksiliste mõjutuste esilekutsumisega, kuid mis ei mõjuta reproduktiivset käitumist ega ellujäämist. Annuse/-vastusreaktsiooni suhte kindlakstegemiseks on vaja katsesse lisada kaks madalamat annust. Mittetoksilise kemikaali puhul tuleb uurida maksimaalset praktiliselt kasutatavat annust.

Protseduur

Uuritava aine manustamine ja paaritamine

Kasutusel on kaks skeemi. Kõige laialdasemalt kasutatakse uuritava aine ühekordset manustamist. Võib kasutada ka uuritava aine manustamist seitsmel päeval nädalas 35 päeva järjest. Manustamisele järgnev paarituste arv sõltub manustamisskeemist ja peaks tagama, et proove võetaks kõigist iduraku staadiumidest. Pärast paaritusperioodi lõppu pannakse emasloomad eraldi puuridesse. Kui emasloom poegib, märgitakse üles poegimise kuupäev ja järglaste arv ning sugu. Kõik isased järeltulijad võõrutatakse ja kõik emased järeltulijad hukatakse, välja arvatud juhul, kui nad on kaasatud eksperimenti.

Translokatsiooni heterosügootsuse testimine

Kasutatakse ühte kahest võimalikust meetodist:

— F_1 järglaskonna viljakuse testimine ja järgnev võimalike translokatsiooni kandjate kindlakstegemine tsütogeneetilise analüüsi abil;

— kogu isase F_1 järglaskonna tsütogeneetiline analüüs ilma eelneva fertiilsuse testimisel põhineva selektsioonita.

a) Viljakuse testimine

Vähenenud viljakust F_1 indiviididel saab kindlaks teha pesakonna suuruse põhjal ja/või paaritatud emaste emaka sisu analüüsimisel.

Normaalse ja vähenenud viljakuse määratlemise kriteerium peab olema kasutava hiireliini jaoks kindlaks määratud.

▼B

Pesakonna suuruse jälgimine: uuritavad F_1 isased paigutatakse individuaalselt puuridesse kas koos sama eksperimendi või kolooniast saadud emastega. Puure kontrollitakse iga päev 18. paaritusjärgsest päevast alates. Pesakonna suurus ja sooline vahekord registreeritakse F_2 põlvkonna sünnimomendil ja seejärel pesakond likvideeritakse. Kui testitakse emast F_1 järglaskonda, siis jäetakse väikeste pesakondade F_2 järglased ellu edaspidisteks testimisteks. Emaseid translokatsiooni kandjaid kontrollitakse tsütogeneetilise translokatsiooni analüüsiga kõigi nende isaste järeltulijate põhjal. XO-emaseid tuntakse ära sugude suhte muutumise põhjal nende järglaskonnas suhtelt 1:1 suhtele 1:2 isased *vs.* emased. Järgnevas protseduuris elimineeritakse normaalsed F_1 loomad edasisest testimisest, kui esimene F_2 pesakond saavutab või ületab predetermineeritud normaalväärtuse, vastasel korral võetakse vaatluse alla teine või kolmas F_2 pesakond.

F_1 loomi, keda ei saa kuni kolme F_2 pesakonna jälgimise põhjal normaalseks tunnistada, kas testitakse edasi paaritatud emaste emaka sisu analüüsimisega või tehakse kohe tsütogeneetiline analüüs.

Emaka sisu analüüsimine: pesakonna suuruse vähenemine translokatsiooni kandjatel on põhjustatud loodete embrüonaalsest hukkumisest, nii et surnud implantaatide suur arv peegeldab translokatsiooni esinemist testitaval loomal. Igat testitavat F_1 isaslooma paaritatakse 2–3 emasega. Viljastumine tehakse kindlaks igahommikuse vaginaalkorkide olemasolu kontrollimisega. Emased surmatakse 14–16 päeva pärast ning nende emakates loendatakse elusad ja surnud implantaadid.

b) Tsütogeneetiline analüüs

Testised valmistatakse ette õhu käes kuivatamise tehnika abil. Translokatsiooni kandjad identifitseeritakse multivalentsete konfiguratsioonide leiu alusel diakineesi I metafaasis olevatel primaarsetel spermatotsüütidel. Vähemalt kahe multivalentse assotsiatsiooniga raku leidmine on piisavaks tõestuseks, et testitav loom on translokatsiooni kandja.

Juhul kui aretusselektsiooni pole rakendatud, kontrollitakse kõiki F_1 isasloomi tsütogeneetiliselt. Mikroskoopiliselt tuleb uurida vähemalt 25 diakineesi I metafaasis olevat rakku ühe isase looma kohta. Mitootiliste metafaaside uurimine kas spermatogoonia ajal või luuüdis on nõutav F_1 isaste puhul, kellel on väikesed testised ja meioosi katkemine enne diakineesi või F_1 emastel XO kahtlusalusklaasidel. Ebatavaliselt pika ja/või lühikese kromosoomi olemasolu igas kümnes rakus kümnest on erilise steriilsust põhjustava translokatsiooni (c-t tüüpi) tõenduseks isasloomal. Mõnesid X-autosoomi translokatsioone, mis põhjustavad isaste steriilsust, saab identifitseerida ainult mitootiliste kromosoomide bandinganalüüsi abil. 39 kromosoomi esinemine igas kümnes mitoosis kümnest on tõestuseks emase XO seisundile.

2. **ANDMED**

Andmed esitatakse tabelis.

Keskmine pesakonna suurus ja sugude suhe sünnimomendil ja võõrutamise ajal registreeritakse iga paaritusintervalli kohta.

▼B

F_1 loomade viljakuse hindamiseks esitatakse keskmine pesakondade suurus kõikide normaalsete paarituste kohta ja individuaalne pesakonna suurus F_1 translokatsiooni kandjatel. Emaka sisaldise analüüsimiseks registreeritakse elus ja surnud implantaatide keskmine arv normaalpaarituste korral ja individuaalsed elus ja surnud implantaatide arvud iga F_1 translokatsiooni kandja paarituse kohta.

Diakineesi I metafaasi tsütokineetilisel analüüsil leitakse multivalentsete konfiguratsioonide arv ja tüübid ja antakse rakkude üldarv iga translokatsiooni kandja kohta.

Steriilsete F_1 indiviidide puhul registreeritakse paarituste üldarv ja paaritusperioodi kestus. Antakse testiste kaalud ja tsütogeneetilise analüüsi detailid.

XO emaste puhul registreeritakse keskmine pesakonna suurus, sugude suhe F_1 järglaskonnas ja tsütogeneetilise analüüsi tulemused.

Kus on võimalik, eelselekteeritakse F_1 translokatsiooni kandjad fertiilsustesti põhjal, tabelid peavad sisaldama informatsiooni selle kohta, kui paljude korral neist oli tõestatud translokatsiooniline heterosügootsus.

Esitatakse negatiivsete ja positiivsete kontrollide testimisandmed.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— hiirte liin, loomade vanus, töödeldud loomade kaalud;

— mõlemast soost vanemloomade arv katse- ja kontrollgrupis;

— katsetingimused, detailne aine manustamise kirjeldus, annused, lahustid, paarituste skeem;

— järglaste arv ja sugu ühe emase kohta, saadud järglaste arv ja sugu translokatsiooni analüüsil;

— translokatsiooni analüüsi aeg ja kriteeriumid;

— translokatsiooni kandjate arv ja detailne kirjeldus, kus võimaluse korral oleks antud ka paarituste andmed ja emaka sisaldise uurimise andmed;

— tsütogeneetilised protseduurid ja mikroskoopilise uuringu detailid, eelistatavalt koos piltidega;

— statistiline hinnang;

— tulemuste arutelu;

— järeldused.

▼B

3.2. HINNANG JA JÄRELDUSED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. **VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B

B.26. **SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE – SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE UURING NÄRILISTEL**

1. **MEETOD**

Käesolev subkroonilise suukaudse toksilisuse uurimismeetod lähtub juhendist OECD TG 408 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Kemikaali toksiliste omaduste määramisel ja hindamisel võib teha subkroonilise suukaudse toksilisuse katseid, kasutades kordusdoose pärast seda, kui toksilisuse kohta on akuutsetest või 28päevastest kordusdoosidega toksilisuse katsetest saadud esialgne teave. 90päevane uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral pikaajalise perioodi jooksul alates võõrutusjärgsest küpsemisest kuni täisealiseks arenemiseni. Uuring annab teavet toksilisuse peamiste mõjude kohta, tuvastab sihtorganid ja akumuleerumisvõimaluse ja võib anda katsealustele organismidele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni väärtuse, mida saab kasutada doositasemete valimisel krooniliste mõjude uurimisel ja kokkupuutel inimestega ohutuskriteeriumide väljatöötamisel.

Meetod asetab lisarõhu neuroloogilistele küsimustele ja selle abil saadakse teavet immunoloogilist ja paljunemisvõimet puudutavate mõjude kohta. Samuti rõhutatakse vajadust teha loomade hoolikas kliiniline läbivaatus, et hankida võimalikult palju teavet. Kõnealune uuring peaks võimaldama määrata neid kemikaale, mis on võimelised põhjustama neurotoksilist ja immunoloogilist mõju või mõju paljunemisorganitele, mis võib tagada edasise sügavuti uuringu.

Vt ka üldise sissejuhatuse B osa.

1.2. MÕISTED

Doos – uuritava aine manustatav kogus. Doosi väljendatakse massina (g, mg) või uuritava aine massina katsealuse looma kaaluühiku kohta (nt mg/kg) või toidus oleva püsikontsentratsioonina (ppm).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, manustamise sagedust ja doseerimise kestust.

NOAEL – lühend sõnadest „no observed adverse effect level” ehk doosi kõige kõrgem tase, mis vastab katseorganismidele täheldatavat toimet mitteavaldavale kontsentratsioonile.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritavat ainet manustatakse katseloomade erinevatele rühmadele suu kaudu iga päev astmeliselt suurenevates doosides, üks doosi suurus rühma kohta 90 päeva jooksul. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi hoolikalt mürgitusnähtude suhtes. Loomad, kes surevad või katse jooksul tapetakse, lahatakse ja uuringu lõppedes tapetakse ja lahatakse ka need loomad, kes jäid ellu.

▼B

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Loomade ettevalmistamine**

Kasutada tuleks terveid loomi, kes on laborooritingimustega vähemalt viie päeva jooksul kohanenud ning keda ei ole varem uuringutes kasutatud. Katseloomi tuleks kirjeldada vastavalt nende liigile, liinile, päritolule, soole, kaalule ja/või vanusele. Loomad tuleks kontroll- ja menetlusrühmadesse paigutada juhuslikult. Puurid tuleks asetada nii, et puuri ümberasetamisega seotud võimalikud mõjud oleks minimaalsed. Igale loomale peab määrama unikaalse identifitseerimisnumbri.

1.4.2. **Dooside ettevalmistamine**

Uuritavat ainet manustatakse kunstlikult või koos toidu või joogiveega. Suukaudse manustamise meetod sõltub uuringu eesmärgist ja uuritava aine fuüsikalis-keemilistest omadustest.

Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav aine sobivas vehiikelis. Soovitatakse, et võimaluse korral tuleks kõigepealt kasutada vesilahust/suspensiooni, seejärel õlilahust/emulsiooni (nt maisiõli) ja siis lahustamist teistes vehiikelites. Mittevesilahuseliste vehiikelite puhul peab teadma kandeaine toksilisi omadusi. Kindlaks tuleks määrata uuritava aine püsivus manustamise tingimustes.

1.4.3. **Katsetingimused**

1.4.3.1. *Katseloomad*

Närilistest eelistatakse rotte, kuigi kasutada võib ka teisi närilisi, nt hiiri. Katseloomadena tuleks kasutada üldkasutatavate tervete täiskasvanud laboratooriumiloomade aretusliine. Emasloomad peaksid olema nullpaarid ja nad ei tohiks olla tiined. Doseerimisega tuleks alustada võimalikult kohe pärast võõrutamist ja igal juhul enne loomade üheksanädalaseks saamist. Uuringu alguses peaks loomade kaaluerinevus olema minimaalne ega tohiks ületada ± 20 % kummastki soost loomade keskmisest kaalust. Kui uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlemas uuringus kasutada samast aretusliinist ja sama päritoluga loomi.

1.4.3.2. *Arv ja sugu*

Igal doositasemel tuleks kasutada vähemalt 20 looma (10 emast ja 10 isast). Kui osa loomi on kavas katse käigus tappa, tuleks loomade arvu enne katse lõppu tapetavate loomade arvu võrra suurendada. Tuginedes eelnevatele teadmistele kemikaali või selle lähedase analoogi kohta, tuleks kaaluda kümneloomalise (viis kummastki soost) satelliitrühma lisamist kontrollrühma ja suurima doosi rühma, et jälgida pärast manustamisperioodi lõppu mis tahes toksilise toime pöörduvust või püsivust. Selle menetlusjärgse perioodi kestus tuleks dokumenteerida vastavalt täheldatud mõjudele.

▼B

1.4.3.3. *Annused*

Uuringus tuleb kasutada vähemalt kolme doositaset ja uuringuga samal ajal peab tegema ka kontrolli, välja arvatud siis, kui tehakse piirsisalduskatse (vt 1.4.3.4). Doositasemed võivad põhineda kordusdoosi või vahemiku leidmise uuringu tulemustel ja peaksid arvesse võtma uuritava aine või sellega seotud materjalide kohta olemasolevat toksikoloogilist ja toksikokineetilist teavet. Kui uuritava aine füüsikalis-keemilised omadused või bioloogiline mõju ei piira suurima doosi valimist, tuleb doositase valida nii, et sellega kaasneks mürgitus, kuid et see ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Dooside suurused tuleks valida kahanevas järjekorras eesmärgiga näidata iga doosiga seotud reaktsioonid ja katseorganismidele täheldatavat toimet mitteavaldav sisaldus (NOAEL) kõige madalama annuse korral. Kahanevate annuste puhul on tavaliselt optimaalsemad kahe- kuni neljakordsed intervallid ja väga pikkadele intervallidele (nt kui koefitsient on 6–10) eelistatakse tavaliselt neljanda katserühma lisamist.

Kontrollrühm peab olema rühm, millele ei manustata, või rühm, mis saab vehiikelit siis, kui uuritava aine manustamisel kasutatakse vehiikelit. Kontrollrühma loomi tuleb käidelda samal viisil kui katserühmade loomi, välja arvatud see, et neile ei anta uuritavat ainet. Kui kasutatakse vehiikelit, manustatakse kontrollrühmale vehiikelit suurimas kasutatavas ruumalas. Kui uuritavat ainet antakse koos toiduga ja see põhjustab toidu tarbimise vähenemist, võib paaristoidetav kontrollrühm olla kasulik selleks, et teha vahet maitsest või katsemudelis aset leidnud toksikoloogilistest muutustest põhjustatud vähenemistel.

Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmisi vehiikeli ja teiste lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotuvusele, ainevahetusele või retentsioonile; mõju uuritava aine keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi; ja mõju loomade toidu või vee tarbimisele või nende toitumisseisundile.

1.4.3.4. *Piirsisalduskatse*

Kui katses ei tuvastata käesolevas uuringus kirjeldatud menetlusega päevadoosil 1 000 mg kehakaalu kg kohta täheldatavat toksilist toimet ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga ainete osas saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta suurema doosiga uuringut vajalikuks. Teha võib piirsisalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

1.5. ANALÜÜSI KAIK

1.5.1. **Doseerimine**

Loomadele doseeritakse uuritavat ainet seitsmel päeval nädalas ja 90 päeva jooksul. Mis tahes muu doseerimismeetodi, nt viis päeva nädalas, kasutamist tuleb põhjendada. Kui uuritavat ainet manustatakse kunstlikult, peaks seda tegema loomadele ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Maksimaalne vedelikumaht, mida võib korraga loomale manustada, sõltub katselooma suurusest. Maht ei tohiks ületada 1 ml kehakaalu 100 g kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, mille puhul võib kasutada ka suhet 2 ml kehakaalu 100 g kohta. Välja arvatud ärritavate ja söövitavate ainete puhul, millel on suurematel kontsentratsioonidel tavaliselt halvem toime, tuleks katsemahu varieeruvus muuta minimaalseks sellega, et kõikide annuste puhul kohandatakse ühesuguse mahu tagamiseks kontsentratsiooni.

▼B

Ainete puhul, mida manustatakse toidu või joogiveega, on oluline tagada, et toiduga kasutatavad uuritava aine kogused ei häiriks tavalist toitmise või joogivee tasakaalu. Kui uuritavat ainet manustatakse toiduga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni toidus (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehakaalule; tuleks täpsustada, millist võimalust kasutatakse. Kui ainet manustatakse kunstlikult, tuleks doos anda igal päeval samal ajal ning seda tuleks vajaduse korral kohandada, et looma kehakaalu suhtes säiliks püsiv doositase. Kui 90päevane uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlema uuringu puhul kasutada samasugust toitu.

1.5.2. **Vaatlused**

Vaatlusperiood peaks kestma vähemalt 90 päeva. Järelvaatluse jaoks planeeritud satelliitrühma loomad tuleks hoida sobiva perioodi jooksul menetlemata, et oleks võimalik avastada toksilise toime pööratavust või püsivust.

Vähemalt üks kord päevas tuleks teha üldine kliiniline läbivaatus, eelistatavalt igal päeval samal ajal (samadel aegadel), arvestades eeldatavat mõju kõrgperioodil pärast doseerimist. Loomade kliiniline seisund tuleks dokumenteerida. Vähemalt kaks korda päevas, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, tuleks kontrollida, kas loomad on haigestunud või surnud.

Vähemalt üks kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada subjektide omavahelist kõrvutamist) ja pärast seda kord nädalas tuleks teha kõikide loomade üksikasjalik kliiniline läbivaatus. Need vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, eelistatavalt selleks ette nähtud kohas ja iga kord samal ajal. Tulemused tuleks hoolikalt üles märkida, kasutades selleks võimaluse korral katselabori poolt fikseeritud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et vaatlustingimuste varieeruvus oleks võimalikult minimaalne. Tuvastatud märgid peaksid hõlmama lisaks muule muutusi nahal, karvades, silmades, limaskestas, ekstraktide ja eritiste esinemist ning autonoomseid toiminguid (nt pisarate vool, piloerektsioon, pupillide suunis, ebaregulaarne hingamine). Samuti tuleks üles märkida muudatused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad endaga ümberkäimisele reageerivad, samuti kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldus, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, vastupidine käitumine) (1).

Oftalmoloogiline läbivaatus, kasutades silmapeeglit või samalaadset sobivat vahendit, tuleks teha enne uuritava aine manustamist ja uuringu lõppedes eelistatavalt kõikidel loomadel, kuid vähemalt suure doosiga rühmas ja kontrollrühmas. Kui silmades avastatakse muutusi, tuleb läbi vaadata kõik loomad.

Kokkupuuteperioodi lõpupoole, kuid mitte varem kui 11. nädalal, tuleks läbi viia sensoorse reageerimise kontroll erinevat liiki ärritajatele (1) (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptori ärritustele) (2, 3, 4), kinnihaaramise tugevuse (5) ja motoorse aktiivsuse (6) hindamine. Võimalike meetodite täpsemad üksikasjad on esitatud vastavates viidetes. Siiski võib kasutada ka muid meetodeid kui need, millele viidatakse.

Funktsionaalsed vaatlused, mis viiakse läbi uuringu lõpupoole, võib ka ära jätta, kui on olemas teiste uuringute funktsionaalsete vaatluste andmed ja kui igapäevased kliinilised vaatlused ei toonud esile mingeid funktsionaalseid vaegusi.

▼B

Erandkorras võib funktsionaalsed vaatlused ära jätta rühmade puhul, millel esineb toksilisuse märke niisugusel määral, et see takistaks märkimisväärselt funktsionaalsete katsete läbiviimist.

1.5.2.1. *Kehakaal ja toidu/vee tarbimine*

Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas. Toidu tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat ainet manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist samuti vähemalt kord nädalas mõõta. Vee tarbimise mõõtmist võib kaaluda ka selliste toitumis- või sundsöötmise uuringute korral, mille jooksul võib joomisaktiivsuses esineda muutusi.

1.5.2.2. *Hematoloogia ja kliiniline biokeemia*

Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast ja neid tuleks vajaduse korral säilitada sobivates tingimustes. Katseperioodi lõpus võetakse proovid vahetult enne loomade tapmist või selle käigus.

Katseperioodi lõpul või kui võetakse vahepealseid vereproove, tuleks teha järgmised hematoloogilised uuringud: hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja diferentseeritud arv, vereliistakute arv ja vere hüübimisaja/hüübimisvõime mõõtmine.

Kliinilised biokeemilised analüüsid peamiste toksiliste mõjude uurimiseks kudedes ja eelkõige nende toime uurimisel neerudele ja maksale tuleks teha vereproovidega, mis on võetud loomadelt vahetult enne tapmist või selle ajal (välja arvatud loomad, kes leiti surevana ja/või tapeti katse ajal). Nii nagu hematoloogilisel uuringul, võib võtta ka kliiniliste biokeemiliste katsete jaoks vahepealseid proove. Üks öö enne vereproovi võtmist soovitatakse loomadel paastuda ([1]). Plasma või seerumiuuringud peavad hõlmama naatriumi, kaaliumi, glükoosi, üldkolesterooli, karbamiidi, kreatiniini, üldvalku ja albumiini, vähemalt kahte hepatotsellulaarsele toimele osutavat ensüümi (näiteks alaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, aluseline fosfataas, gammaglutamüültranspeptidaas, ja sorbitooldehüdrogenaas). Teha võib ka muude ensüümide (maksa või teiste organite) ja sapphapete mõõtmisi, mis võivad teatavatel tingimustel anda kasulikku teavet.

Alternatiivselt on uuringu viimasel nädalal võimalik loomadelt uriiniproovide kogumise teel teha järgmisi uriinianalüüse: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, valk, glükoos ja veri/vererakud.

Lisaks sellele tuleks uurida, kas seerumis on üldistele koekahjustustele osutavaid markereid. Muud määramised, mis tuleks teha juhul, kui uuritava aine teadaolevad omadused võivad mõjutada või mõjutavad eeldatavasti sellega seotud ainevahetuse profiili, hõlmavad kaltsiumi, fosforit, triglütseriide, mis on määratud enne sööki, teatavaid hormoone, methemoglobiini ja koliinesteraasi. Need on vaja määrata teatavatesse klassidesse kuuluvate ainete puhul või konkreetsete juhtude põhiselt.

([1]) Mitmete seerumi ja plasma, peamiselt glükoosi mõõtmiste korral ei tohiks loomadele eelneva öö jooksul toitu anda. Selle peamiseks põhjuseks on see, et toidu andmise korral oleks tulemuste varieeruvus suurem ning see varjaks raskemini tuvastatava toime ning muudaks tõlgendamise raskeks. Teisest küljest võib see aga häirida loomade tavapärast üldist ainevahetust ja eelkõige toitumisuuringute puhul võib see häirida igapäevaseid kokkupuuteid uuritava ainega. Kui loomadele ei anta öö jooksul toitu, tuleks uuringu neljandal nädalal tehtud funktsionaalsete vaatluste järel teha kliinilis-biokeemilised määramised

▼B

Üldiselt on vaja paindlikku lähenemisviisi, mis sõltub vastava aine liigist ja selle täheldatud ja/või oodatud toimest.

Kui varasemad lähteandmed ei ole piisavad, tuleks enne doseerimise alustamist määrata hematoloogilised ja kliinilis-biokeemilised muutujad; tavaliselt ei soovitata neid andmeid hankida enne menetlust (7).

1.5.2.3. *Täielik lahang*

Kõik uuringusse kaasatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki haavu, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisu. Kõikide loomade (välja arvatud need, kes leitakse surevatena ja/või tapetakse uuringu ajal) maks, neerud, neerupealsed, munandid, munandimanused, emakas, munasarjad, harknääre, põrn, aju ja süda tuleb vajaduse korral puhastada muudest kudedest ja nende märgmass määratakse kuivamise vältimiseks võimalikult kiiresti pärast dissekteerimist.

Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu seisukohast kõige sobivamas fiksaatoris: kõik silmaga täheldatavad vigastused, aju (olulised piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju ja medulla/ajusild), seljaaju (kolmel tasandil: tservikaalne, poolrindmik, lumbaarne), ajuripats, kilpnääre, kõrvalkilpnääre, harknääre, söögitoru, süljenäärmed, magu, peen- ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, kõhunääre, neerud, neerupealsed, põrn, süda, trahhea ja kopsud (mis puhutakse kõigepealt säilitusainet täis ja seejärel sukeldatakse sinna), aort, sugunäärmed, emakas, lisasuguorganid, emaste rinnanäärmed, eesnääre, kusepõis, sapipõis (hiir), lümfisõlmed (eelistatult üks lümfisõlm, mis hõlmab manustamiskohta, ja teine lümfisõlm, mis on manustamiskohast eemal, et anda teavet süsteemse toime kohta), perifeerne närv (istmiku- või sääreluu närv), mis on eelistatult lihase lähedal, ning osa luuüdi (või alternatiivselt väike kogus toorest luuüdi), nahk ja silmad (kui oftalmoloogilise läbivaatuse käigus avastati muutusi). Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka teisi kudesid. Säilitada tuleks ka teised organid, mis on uuritava aine teadaolevatest omadustest tulenevalt tõenäoliselt sihtorganid.

1.5.2.4. *Histopatoloogia*

Kõikide võrdlusrühma ja kõrge doosiga rühmade loomade säilitatud organeid ja kudesid tuleks histopatoloogiliselt põhjalikult uurida. Histopatoloogilised uuringud tuleks läbi viia ka teiste doosirühmade loomade puhul juhul, kui kõrge doosiga rühma osas tuvastatakse manustamisega seotud muudatusi.

Uurida tuleks kõiki silmaga täheldatavaid kahjustusi.

Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogiline uuringteha nende kudede ja organite puhul, millel esineb samasugune toime kui katserühma puhul.

▼B

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

2.1. ANDMED

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel tapetud loomade arv, toksiliste märkidega loomade arv, täheldatud toksiliste märkide kirjeldus, sealhulgas toksilise toime ilmnemine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta loomade protsent, kellel neid esines.

Kui võimalik, tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohaste ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistiliste meetodite ja analüüsitavate andmete valik tuleks teha uuringu kavandamisel.

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. **Uuritav aine:**

— füüsikaline loomus, puhtus ning füüsikalis-keemilised omadused;

— identifitseerimisandmed;

— vehiikel (vajaduse korral): vehiikeli valiku põhjendamine, kui vehiikeliks ei ole vesi.

2.2.2. **Katseloomade liigid:**

— liik ja kasutatav liin;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, toit jne;

— iga looma kaal katse alguses.

2.2.3. **Katsetingimused:**

— doositaseme valimise põhjendus;

— üksikasjad uuritava aine koostise/toiduvalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

— uuritava aine manustamise üksikasjad;

— tegelikud doosid (mg kehakaalu kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur toidu/joogivee uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) ja tegeliku doosi vahel;

— toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.

2.2.4. **Tulemused:**

— eluskaal ja muutused eluskaalus;

— toidu ja vajaduse korral vee tarbimine;

— toksilise reaktsiooni andmed vastavalt looma soole ja doositasemele, sealhulgas toksilisuse märgid;

▼B

— kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);

— oftalmoloogilise läbivaatuse tulemused;

— sensoorse aktiivsuse, haardetugevuse ja motoorse tegevuse hindamine (kui võimalik);

— hematoloogilised katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;

— kliinilise biokeemia katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;

— lõplik kehakaal, organite kaal ja organite/kehakaalu suhted;

— lahkamise tulemused;

— histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— võimaluse korral andmed imendumise kohta;

— vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

3. **VIITED**

1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999–1003.

3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691–704.

4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267–283.

5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore-and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233–236.

6) Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C, Gill M. W, Reiter L. W, Tilson H. A, MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599–609.

7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198–201.

▼B

B.27. **SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE – SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE UURING MITTENÄRILISTEL**

1. **MEETOD**

See subkroonilise suukaudse toksilisuse uurimismeetod lähtub juhendist OECD TG 409 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Kemikaali toksiliste omaduste kindlaksmääramisel ja hindamisel võib teha subkroonilise suukaudse toksilisuse katseid, kasutades kordusdoose pärast seda, kui on saadud esialgne teave toksilisuse kohta akuutsetest või 28päevastest kordusdoosidega toksilisuse katsetest. 90päevane uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral kiire kasvuperioodi jooksul kuni nooremasse täisikka arenemiseni. Uuring annab teavet toksilisuse peamiste mõjude kohta, tuvastab sihtorganid ja akumuleerumisvõimaluse ja võib anda katsealustele organismidele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni väärtuse, mida saab kasutada doositasemete valimisel krooniliste mõjude uurimisel ja ohutuskriteeriumide väljatöötamisel kokkupuutel inimestega.

Käesolev uurimismeetod võimaldab kindlaks määrata keemilise ainega kokkupuute ebasoodsaid mõjusid mittenäriliste liikidel ja seda tuleks kasutada ainult siis,

— kui teistes uuringutes täheldatud mõjud viitavad vajadusele saada selgust või iseloomustust teise, mittenäriliste liigi kohta või

— kui toksikokineetilised uuringud viitavad sellele, et konkreetse mittenäriliste liigist laboratooriumiloomade kasutamine on parim valik, või

— kui mõni muu konkreetne põhjus õigustab mittenäriliste liigi kasutamist.

Vt ka üldise sissejuhatuse B osa.

1.2. MÕISTED

Doos – uuritava aine manustatav kogus. Doosi väljendatakse massina (g, mg) või uuritava aine massina katsealuse looma kaaluühiku kohta (nt mg/kg) või toidus oleva püsikontsentratsioonina (ppm).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, selle sagedust ja doseerimise kestust.

NOAEL – lühend sõnadest „no observed adverse effect level” ehk dooside kõige kõrgem tase, mis vastab katseorganismidele täheldatavat toimet mitteavaldavale sisaldusele.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine manustatakse erinevatele katseloomade rühmadele suu kaudu kord päevas astmeliselt suureneva koguse kaupa selliselt, et üks rühm saaks 90 päeva jooksul ainult ühte doosi. Manustamisperioodi jooksul vaadeldakse loomi põhjalikult toksilisuse märkide tuvastamiseks. Katse ajal surnud või tapetud loomad lahatakse ning katse lõppemisel tapetakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

▼B

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Loomaliigi valik**

Tavaliselt kasutatav mittenäriliste liik on koerad, kelle tõug peaks olema täpselt määratletud; sageli kasutatakse jänesekoeri. Kasutada võib ka teisi liike, nt sigu ja minisigu. Esikloomaliste kasutamine ei ole soovitatud ja nende kasutamist tuleb põhjendada. Kasutada tuleks noori, terveid loomi ja koerte puhul võiks doseerimine eelistatavalt alata 4-6 kuu aga mitte hiljem kui üheksa kuu vanuselt. Kui uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlemas uuringus kasutada sama liiki/tõugu loomi.

1.4.2. **Loomade ettevalmistamine**

Kasutada tuleks terveid noori loomi, kes on aklimatiseerunud laboratooriumi tingimustega ning keda ei ole varem uuringus kasutatud. Aklimatiseerumise kestus sõltub valitud katselooma liigist ja päritolust. Selle kestuseks soovitatakse vähemalt viis päeva koertele või vastaval eesmärgil kohapeal kasvatatavatele sigadele ja vähemalt kaks nädalat kõnealustele loomadele, kui need on pärit väljastpoolt laboratooriumi. Katseloomad tuleks kirjeldada vastavalt nende liigile, liinile, päritolule, soole, kaalule ja/või vanusele. Loomad tuleks juhuslikult paigutada kontroll- ja katserühmadesse. Puurid tuleks asetada nii, et puuri ümberasetamisega seotud võimalikud mõjud oleks minimaalsed. Igale loomale peab määrama unikaalse identifitseerimisnumbri.

1.4.3. **Dooside ettevalmistamine**

Uuritavat ainet võib manustada söögi või joogiveega, sundsöötmisega või kapslitena. Suukaudse manustamise meetod sõltub uuringu eesmärgist ja uuritava aine füüsikalis-keemilistest omadustest.

Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav aine sobivas vehiikelis. Soovitatakse, et võimaluse korral tuleks kõigepealt kasutada vesilahust/suspensiooni, seejärel õlilahust/emulsiooni (nt maisiõli) ja siis lahustamist teistes vehiikelites. Mittevesilahuseliste vehiikelite puhul peab teadma vehiikeli toksilisi omadusi. Kindlaks tuleks määrata uuritava aine püsivus manustamise tingimustes.

1.5. KATSE KÄIK

1.5.1. **Loomade arv ja sugu**

Iga doositaseme juures tuleks kasutada vähemalt kaheksat looma (nelja emast ja nelja isast). Kui osa loomi on kavas katse käigus tappa, tuleks loomade arvu enne katse lõppu tapetavate loomade arvu võrra suurendada. Loomade arv uuringu lõpul peab olema piisav toksilise mõju adekvaatseks hindamiseks. Tuginedes eelnevatele teadmistele aine või selle lähedase analoogi kohta, tuleks kaaluda kaheksaloomalise (neli kummastki soost) satelliitrühma lisamist kontrollrühma ja suurima doosi rühma, et jälgida pärast manustamisperioodi lõppu mis tahes toksilise toime pööratavust või püsivust. Selle menetlusjärgse perioodi kestus tuleks dokumenteerida vastavalt täheldatud mõjudele.

▼B

1.5.2. **Doseerimine**

Uurimuses tuleb kasutada vähemalt kolme doositaset ja ühel ajal uuringuga peab tegema ka kontrolli, välja arvatud piirsisalduskatse tegemisel (vt 1.5.3). Doositasemed võivad põhineda kordusdoosi või vahemiku leidmise uuringu tulemustel ja peaksid arvesse võtma uuritava ühendi või sellega seotud materjalide kohta olemasolevat toksikoloogilist ja toksikokineetilist teavet. Kui uuritava aine füüsikalis-keemilised omadused või bioloogiline mõju ei piira suurima doosi valimist, tuleb doositase valida nii, et sellega kaasneks mürgitus, kuid et see ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Doositasemed tuleks valida kahanevas järjekorras, eesmärgiga näidata iga doosiga seotud reaktsioonid ja katseorganismidele tähelddatavat toimet mitteavaldav sisaldus (NOAEL) kõige madalamal doositasemel. Sageli on kõige optimaalsemad kahe- kuni neljakordsed erinevused alanevate doositasemete korral ja sageli on kasulikum lisada neljas katserühm, kui kasutatakse väga suuri vahesid dooside vahel (nt suuremaid kui 6–10kordseid).

Kontrollrühm peab olema rühm, millele ei manustata, või rühm, mis saab vehiikelit, kui uuritava aine manustamisel kasutatakse vehiikelit. Kontrollrühma loomi tuleb käidelda samal viisil kui katserühmade loomi, välja arvatud see, et neile ei anta uuritavat ainet. Kui kasutatakse vehiikelit, manustatakse kontrollrühmale vehiikelit suurimas kasutatavas ruumalas. Kui uuritavat ainet antakse koos toiduga ja see põhjustab toidu tarbimise vähenemist, võib paaristoidetav kontrollrühm olla kasulik selleks, et teha vahet maitsest või katsemudelis aset leidnud toksikoloogilistest muutustest põhjustatud vähenemisel.

Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmiseid vehiikeli ja teiste lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotumisele, ainevahetusele või retentsioonile; mõju uuritava aine keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi; ja mõju loomade toidu või vee tarbimisele või nende toitumisseisundile.

1.5.3. **Piirsisalduskatse**

Kui katse ühe doosi suurusega, mis on vähemalt 1 000 mg looma kehakaalu kg kohta ööpäevas, kasutades käesoleva uuringu jaoks kirjeldatud töökorda, ei põhjusta märgatavat ebasoodsat mõju ja kui toksilisust ei eeldata samalaadse struktuuriga ainete kohta käivate andmete põhjal, ei ole kolme doosi suurustega täisuuring vajalik. Teha võib piirsisalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

1.5.4. **Doseerimine**

Loomadele doseeritakse uuritavat ainet seitsmel päeval nädalas ja 90 päeva jooksul. Mis tahes muu doseerimisrežiim, nt viis päeva nädalas, vajab põhjendamist. Kui uuritavat ainet manustatakse kunstlikult, peaks seda tegema loomadele ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Maksimaalne vedelikumaht, mida võib korraga loomale manustada, sõltub katselooma suurusest. Tavaliselt tuleks hoida need mahud võimalikult madalal. Välja arvatud ärritavate või söövitavate ainete puhul, millel on suurematel kontsentratsioonidel tavaliselt halvem toime, tuleks katsemahu varieeruvus muuta minimaalseks sellega, et kõikidel doositasemetel kohandatakse ühesuguse mahu tagamiseks kontsentratsiooni.

▼B

Ainete puhul, mida manustatakse toidu või joogiveega, on oluline tagada, et toiduga kasutatavad uuritava aine kogused ei häiriks tavalist toitmise või joogivee tasakaalu. Kui uuritavat ainet manustatakse toiduga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni toidus (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehakaalule; valitud alternatiiv tuleb täpsustada. Kui ainet manustatakse kunstlikult, tuleks doos anda igal päeval samal ajal ning seda tuleks vajaduse korral kohandada, et looma kehakaalu suhtes säiliks püsiv doositase. Kui 90päevane uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlemas uuringus kasutada samalaadset toitu.

1.5.5. **Vaatlused**

Vaatlusperiood peaks kestma vähemalt 90 päeva. Järelvaatluse jaoks planeeritud satelliitrühma loomad tuleks hoida sobiva perioodi jooksul menetlemata, et oleks võimalik avastada toksilise toime pööratavust või püsivust.

Vähemalt üks kord päevas tuleks teha üldine kliiniline läbivaatus, eelistatavalt igal päeval samal ajal/samadel aegadel, arvestades eeldatavat mõju kõrgperioodil pärast doseerimist. Loomade kliiniline seisund tuleks dokumenteerida. Vähemalt kaks korda päevas, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, tuleks kontrollida, kas loomad on haigestunud või surnud.

Vähemalt üks kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada subjektide omavahelist kõrvutamist) ja pärast seda kord nädalas tuleks teha kõikide loomade üksikasjalik kliiniline läbivaatus. Kui see on praktiliselt võimalik, tuleks sellised vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, selleks ettenähtud kohas ja eelistatavalt iga kord samal ajal. Tuleks üritada tagada, et vaatlustingimuste varieerumine oleks minimaalne. Toksilisuse nähud tuleks koos nende algusaja, raskusastme ja kestusega hoolikalt üles märkida. Vaatlus peaks sealhulgas sisaldama muutusi nahal, karvkattes, silmades, limaskestadel, sekretsiooni ja ekskretsiooni esinemises ja autonoomses tegevuses (nt pisaratevool, karvade jäigastumine, pupilli suurus, ebatavaline hingamisrütm). Samuti tuleks üles märkida muutused käimises, seisangus ja samuti reageerimine käitlemisele ning klooniliste või tooniliste liigutuste esinemine, stereotüübid (nt liigne karvade puhastamine, korduv tiirlemine) või igasugune kummaline käitumine.

Oftalmoloogiline läbivaatus, kasutades silmapeeglit või samalaadset sobivat vahendit, tuleks teha enne uuritava aine manustamist ja uuringu lõppedes eelistatavalt kõikidel loomadel, kuid vähemalt suure doosiga rühmas ja kontrollrühmas. Kui silmades avastatakse muutusi, tuleb läbi vaadata kõik loomad.

1.5.5.1. *Kehakaal ja toidu/vee tarbimine*

Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas. Toidu tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat ainet manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist samuti vähemalt kord nädalas mõõta. Vee tarbimise mõõtmist võib kaaluda ka selliste toitumis- või kunstlikult toitmise uuringute korral, mille jooksul võib joomisaktiivsuses esineda muutusi.

▼B

1.5.5.2. *Hematoloogia ja kliiniline biokeemia*

Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast ja neid tuleks vajaduse korral säilitada sobivates tingimustes. Katseperioodi lõpus võetakse proovid vahetult enne loomade tapmist või selle käigus.

Katse alguses tuleks uurida hematoloogiat, sealhulgas hematokritti, hemoglobiini kontsentratsiooni, erütrotsüütide arvu, leukotsüütide üld- ja diferentseeritud arvu, vereliistakute arvu ja mõõta vere hüübimisvõimet, nagu näiteks hüübimise kiirust, protrombiiniaega või tromboplastiiniaega, seejärel kas kord iga kuu või katseperioodi keskel ja lõpuks katseperioodi lõpus.

Kliinilise biokeemia analüüsid, millega uuritakse kõige tähtsamaid mürgi mõjusid kudedes ja eriti selle mõju neerule ja maksale, tuleks teha vereproovide kohta, mis on võetud kõikidelt loomadelt katse alguses, seejärel kas kord iga kuu või katseperioodi keskel ja lõpuks katseperioodi lõpus. Vaatluse alla tuleks võtta sellised uuringuvaldkonnad nagu elektrolüütide tasakaal, sahhariidide ainevahetus ja maksa ning neeru funktsioon. Konkreetsete katsete valikut mõjutavad tähelepanekud uuritava aine mõju kohta. Sõltuvalt liigist ei tohiks loomadele enne vereproovide võtmist teatud aja vältel süüa anda. Soovitatavad analüüsid on kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, paastumise glükoos, alaniinaminotransferaas, aspartaadaminotransferaas, ornitiindekarboksülaas, gamma-glutamüültranspeptidaas, karbamiidlämmastik, albumiin, vere kreatiniin, kogu bilirubiin ja kogu seeriumi valgu mõõtmised.

Uriinianalüüsi peaks tegema vähemalt uuringu alguses, keskel ja lõpus, kasutades uriini kogumist kindlatel aegadel. Uriinianalüüsi puhul määratakse välimus, ruumala, osmolaalsus või erikaal, pH, valk, glükoos ja veri ja/või vererakud. Vajadusel võib kasutada lisaparameetreid, kui on tarvis laiendada täheldatud mõju uurimist.

Lisaks tuleks kaaluda üldisele kudede kahjustusele osutavate markerite uurimist. Muud analüüsid, mis võivad osutuda vajalikuks adekvaatse toksikoloogilise hindamise saamiseks, hõlmavad lipiidide, hormoonide, happe-aluse tasakaalu, methemoglobiini ja kolinesteraasi pärssimise analüüse. Vajadusel võib kasutada täiendavaid kliinilise biokeemia valdkonda kuuluvaid uuringuid, kui on tarvis laiendata täheldatud mõju uurimist. Need tuleb kindlaks määrata teatud klassi kuuluvate kemikaalide puhul või iga juhtumi puhul eraldi.

Üldiselt on vaja paindlikku lähenemist, mis sõltub liigist ja antud aine täheldatud ja/või eeldatavast mõjust.

1.5.5.3. *Täielik lahang*

Kõik uuringusse kaasatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki haavu, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisu. Kõikide loomade (välja arvatud need, kes leitakse surevatena ja/või tapetakse uuringu ajal) maks koos sapipõiega, neerud, neerupealsed, munandid, munandimanused, munasarjad, emakas, kilpnääre (koos kõrvalkilpnäärmetega), harknääre, põrn, aju ja süda tuleb vajaduse korral puhastada muudest kudedest ja nende märgmass tuleks fikseerida võimalikult kohe pärast nende eemaldamist, et vältida kuivamist.

▼B

Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu seisukohast kõige sobivamas fiksaatoris: kõik silmaga täheldatavad vigastused, aju (olulised piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju ja medulla/ajusild), seljaaju (kolmel tasandil: tservikaalne, poolrindmik, lumbaarne), ajuripats, silmad, kilpnääre, kõrvalkilpnääre, harknääre, söögitoru, süljenäärmed, magu, peen- ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, sapipõis kõhunääre, neerud, neerupealsed, põrn, süda, trahhea ja kopsud, aort, sugunäärmed, emakas, lisasuguorganid, emaste rinnanäärmed, eesnääre, kusepõis, lümfisõlmed (eelistatavalt üks lümfisõlm, mis paikneb manustamise teel, ja teine, mis asub manustamise teest kaugel ja näitab süsteemset mõju), perifeerne närv (istmik või sääreluu), eelistatavalt vastava lihase läheduses olev, luuüdi proov (ja/või värske luuüdi aspiraat) ja nahk. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka teisi kudesid. Säilitada tuleks ka teised organid, mis on uuritava aine teadaolevatest omadustest tulenevalt tõenäoliselt sihtorganid.

1.5.5.4. *Histopatoloogia*

Kõikide võrdlusrühma ja kõrge doosiga rühmade loomade säilitatud organeid ja kudesid tuleks histopatoloogiliselt põhjalikult uurida. See uuring tuleks läbi viia ka teiste doosirühmade loomade puhul juhul, kui kõrge doosiga rühma osas tuvastatakse manustamisega seotud muudatusi.

Uurida tuleks kõiki silmaga täheldatavaid kahjustusi.

Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogiline uuring teha nende kudede ja organite puhul, millel esineb samasugune toime kui katserühma puhul.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

2.1. ANDMED

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel tapetud loomade arv, toksiliste märkidega loomade arv, täheldatud toksiliste märkide kirjeldus, sealhulgas toksilise toime ilmnemine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta loomade protsent, kellel neid esines.

Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistilised meetodid ja analüüsitavad andmed tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

▼B

2.2.1. **Uuritav aine:**

— füüsikaline loomus, puhtus ning füüsikalis-keemilised omadused;

— identifitseerimisandmed;

— vehiikel (vajaduse korral): vehiikeli valiku põhjendus, kui vehiikeliks ei ole vesi.

2.2.2. **Katseloomade liigid:**

— liik ja kasutatav liin;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, toit jne;

— iga looma kaal katse alguses.

2.2.3. **Katsetingimused:**

— doositaseme valimise põhjendus;

— üksikasjad uuritava aine koostise/toiduvalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

— uuritava aine manustamise üksikasjad;

— tegelikud doosid (mg kehakaalu kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur toidu/joogivee uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) ja tegeliku doosi vahel;

— toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.

2.2.4. **Tulemused**

— eluskaal/muutused eluskaalus;

— toidu ja vajaduse korral vee tarbimine;

— toksilise reaktsiooni andmed vastavalt looma soole ja doositasemele, sealhulgas toksilisuse märgid;

— kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);

— oftalmoloogiline läbivaatus;

— hematoloogilised katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;

— kliinilise biokeemia katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;

— lõplik kehakaal, organite kaal ja organite kaalu/kehakaalu suhted;

— lahkamise tulemused;

— histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— vajaduse korral tulemuste

— statistiline töötlemine.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

▼B

B.28. **SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST NAHAKAUDSEL MANUSTAMISEL – 90PÄEVANE KORDUVANNUSTE NAHAKAUDSE MANUSTAMISE UURING NÄRILISTE LIIKIDEL**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritavat ainet manustatakse 90 päeva jooksul iga päev suu kaudu gradueeritud annustes mitmele katseloomade rühmale, iga uuringurühm saab eri suurusega annuse. Ravimi manustamise perioodil jälgitakse loomi iga päev, et tuvastada toksilisuse nähtude ilmnemist. Katse ajal surnud loomad lahatakse, katse lõppedes surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad.

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Ettevalmistused**

Loomi hoitakse eksperimentaalsetes elu- ja toitumistingimustes vähemalt viis päeva enne uuringu algust. Enne katse algust terved noored loomad randomiseeritakse ning määratakse ravi- ja kontrollrühmadesse. Vahetult enne uuringut pügatakse katseloomade karv kehatüvelt selja piirkonnast. Kasutada võib raseerimist, kuid seda tuleb teha umbes 24 tundi enne uuringu algust. Korduvat pügamist või raseerimist on tavaliselt vaja rakendada nädalaste intervallidega. Karva lõigates või raseerides tuleb olla ettevaatlik, et mitte nahka kriimustada. Uuritava aine manustamiseks peaks olema paljastatud vähemalt 10 % nahapinnast. Paljastamist vajava nahapinna suuruse ja katmise dimensioonide otsustamisel tuleb arvesse võtta looma kaalu. Tahkete ainete manustamisel pulverisaatoriga, kui see on sobilik, tuleb uuritavat ainet piisavalt niisutada veega või vajadusel sobiva kandeainega, et kindlustada head kontakti nahaga. Vedelaid aineid kasutatakse tavaliselt ilma lahjendamata. Kasutatakse igapäevast manustamist viiest kuni seitsme päevani nädalas.

1.6.2. *Katsetingimused*

1.6.2.1. K a t s e l o o m a d

Kasutada tuleks täiskasvanud rotte, küülikuid või merisigu. Teisi liike võib kasutada, kuid selline otsus peab olema põhjendatud. Uuringu alguses ei tohiks loomade kaal erineda keskmisest rohkem kui ±20 %. Kui subkroonilise nahakaudse manustamise uuring tehakse pikaajalise uuringu eelfaasina, tuleks mõlemas kasutada samu loomaliike ja liine.

▼B

1.6.2.2. Arv ja sugu

Igasse annuserühma peaks kuuluma vähemalt 20 terve nahaga looma (10 isast ja 10 emast). Emasloomad tohi olla poeginud ega tiined. Kui osa loomi kavandatakse surmata uuringu vältel, tuleb katsealuste algarvu suurendada enne uuringu lõppu surmata plaanitud loomade arvu võrra. Peale selle võib moodustada satelliitrühma 20 loomast (10 looma kummastki soost), keda ravida suurte annustega 90 päeva ja jälgida toksiliste toimete pöörduvust, püsivust ja hilinenud avaldumist 28 päeva pärast ravi lõppu.

1.6.2.3. Annused

Kasutada tuleb vähemalt kolme erinevat annust saavat rühma ja ühte kontrollrühma või vehiikli kontrollrühma, kui kasutatakse vehiiklit. Uuritavat ainet tuleks manustada iga päev samal ajal ja annuseid tuleb kohandada kindlate ajavahemike järel (üks või kaks korda nädalas), et säilitada püsiv tase looma kehamassi kohta. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda nii nagu katserühma loomi (v.a uuritava ravimi manustamine). Kui annustamiseks kasutatakse vehiiklit, tuleks kontrollrühmale manustada vehiiklit samal viisil nagu ravirühmale ja nad peaksid seda saama võrdses koguses suurimat annust saava rühmaga. Suurima annuse korral peaks ilmnema toksiline toime, kuid surmajuhte ei tohiks olla või tekib neid vähe. Väikseim annus ei peaks põhjustama mingeid toksilisuse nähte. Kui saadaval on andmeid inimese ekspositsioonist, peaks madalaim annus ületama inimesel kasutatud taset. Ideaalselt peaks keskmine annus põhjustama minimaalset tuvastatavat toksilisust. Kui kasutatakse enam kui ühte vahepealset annusetaset, peaks nende vahed olema sellised, et tekiks toksiliste toimete astmeline suurenemine. Väikesi ja keskmisi annuseid saavates rühmades ja kontrollrühmas peaks surmajuhte olema vähe, et tulemustest saaks teha tähenduslikke järeldusi.

Kui uuritava aine manustamine põhjustab tõsist nahaärritust, tuleb kontsentratsiooni vähendada. See võib kaasa tuua toksiliste toimete vähenemise või puudumise suure annuse rühmas. Kui nahk on raskelt kahjustunud, võib osutuda vajalikuks uuring lõpetada ja alustada uut uuringut madalamate kontsentratsioonidega.

1.6.3. Piirsisalduskatse

Kui eelnev uuring annusega 1 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas või teadaolev inimese ekspositsioon sellest suuremale annusele ei ole põhjustanud toksilisi toimeid, pole edasine uuring vajalik.

1.6.4. Jälgimisaeg

Katseloomi tuleb iga päev jälgida toksilisuse ilmingute suhtes. Registreerida tuleb surma aeg ja aeg, millal toksilisuse nähud ilmuvad või kaovad.

▼B

1.6.5. Protseduur

Loomad peavad olema kambrites ühekaupa. Loomadele manustatakse uuritavat ainet ideaalsel juhul seitse päeva nädalas 90 päeva jooksul.

Satelliitrühmadesse kuuluvaid loomi hoitakse jälgimiseks ilma ravita järgmised 28 päeva, et tuvastada toksilise toime möödumist või püsimist. Ekspositsiooni aeg peab olema kuus tundi päevas.

Uuritavat ainet tuleb manustada ühtlaselt nahapiirkonnale suurusega umbes 10 % kehapinnast. Väga toksiliste ainete puhul võib kasutada väiksemat nahapinda, kuid üldiselt tuleks katta nii suur ala kui võimalik võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Ekspositsiooniaja jooksul hoitakse uuritavat ainet nahaga kontaktis poorse marlisideme ja mitteärritava teibiga. Manustamiskohta tuleb katta sobival viisil, et hoida side ja uuritav aine paigal ja kindlustada, et loomad ei saaks uuritavat ainet alla neelata. Uuritava aine allaneelamise vältimiseks võib kasutada piiravaid vahendeid, kui täielik immobilisatsioon ei ole soovitatav meetod.

Ekspositsiooniaja lõpus tuleb uuritava aine jäägid nahalt kõrvaldada, kui see on rakendatav. Puhastamiseks kasutatakse vett või mõnda muud sobivat nahapuhastamise meetodit.

Kõiki loomi tuleb jälgida iga päev ja registreerida toksilisuse ilmingud, sealhulgas algusaeg, ulatus ja kestus. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, aga ka hingamis-, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Iga nädal tuleks mõõta toidu tarbimist ja loomi kaaluda. Loomade regulaarne jälgimine on vajalik tagamaks niipalju kui võimalik, et loomad ei langeks katsest välja sellistel põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade vale paigutus. Katseperioodi lõpus lahatakse kõik mitte-satelliitravirühma kuulunud loomad. Surevad loomad tuleb eemaldada, surmata ja lahata, kui nad leitakse.

Tavalisel juhul tehakse kõigil loomadel (kaasa arvatud kontrollgruppi kuuluvatel) järgmised uuringud:

a) oftalmoloogiline uuring tuleks teha oftalmoskoobi või sobiva samaväärse vahendi abil enne kokkupuudet uuritava ainega ja uuringu lõppedes kõigile loomadele, kuid kindlasti suuri annuseid saanud ja kontrollrühma kuulunud loomadele. Kui leitakse muutusi silmades, tuleks uurida kõiki loomi;

b) katse lõpus tuleks uurida hematoloogilisi näitajaid, sealhulgas hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide absoluutarv ja valem ning vere hüübimisnäitajaid, nagu näiteks hüübimisaeg, protrombiini aeg, tromboplastiini aeg või trombotsüütide arv;

▼B

c) kliinilise biokeemia näitajaid tuleb määrata uuringuperioodi lõpus. Kõikide uuringute puhul sobivate analüüside hulka kuuluvad elektrolüütide tasakaalu, süsivesikute metabolismi, maksa- ja neerufunktsiooni kajastavad näitajad. Spetsiifiliste testide valik sõltub vaatlusandmetest uuritava aine toimeviisi kohta. Soovitatavad analüüsid on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, tühja kõhu glükoos (liigile kohase näljaperioodiga), seerumi glutamaatpüruvaadi transaminaas, ([1]) seerumi glutamaatoksaloatsetaadi transami-naas, ([2]) ornitiini dekarboksülaas, gammaglutamüültranspeptidaas, uurea lämmastik, albumiin, seerumi kreatiniin, üldbilirubiin ja üldvalk. Toksilisuse adekvaatseks hindamiseks võib olla vajalik määrata järgmisi näitajaid: lipiidid, hormoonid, hape-alus tasakaal, methemoglobiin ja koliinesteraasi aktiivsus. Kui ilmnenud toimeid on vaja põhjalikumalt uurida, võib kasutada veel teisigi kliinilise biokeemia analüüse;

d) uriinianalüüsi ei ole vaja teha rutiinselt, vaid ainult juhul, kui see on näidustatud oodatava või ilmnenud toksilisuse tõttu.

Kui teadaolevad lähteandmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate määramist enne annustamise algust.

L a h a n g

Kõikidele loomadele tuleb teha täielik lahang, mis hõlmab keha välispinna ja kõigi kehaavauste uurimist, samuti kolju, rindkere ja kõhuõõne ja nende sisu uurimist. Maks, neerud, neerupealised ja testised tuleb kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Kõik järgmised organid või koed tuleb säilitada vastavates keskkonnatingimustes võimalikeks hilisemateks histopatoloogilisteks uuringuteks: ajukude, sealhulgas piklikaju/ajusild, väikeaju ja suuraju korteksi lõigud, ajuripats, kilpnääre/kõrvalkilpnääre, kõik harknäärme koed, hingetoru ja kopsud, süda, aort, süljenäärmed, maks, põrn, neerud, neerupealised, pankreas, gonaadid, emakas lisasugunäärmed, sapipõis (kui see on olemas), söögitoru, magu, kaksteistsõrmiksool, tühi- ja niudesool, umbsool, jämesool, pärak, põis, näidislümfisõlmed, (emasloomal piimanäärmed), (reiepiirkonna lihaskond), perifeerne närv, (silmad), rinnak koos luuüdiga, (reieluu, sealhulgas liigespind), (seljaaju kolmel tasemel – kaelaosa, keskmine rinnaosa, lumbaarosa) ja (ekstraorbitaalsed pisaranäärmed). Kudesid, mida on mainitud sulgudes, on vaja uurida ainult juhul, kui see on näidustatud toksilisuse ilmingute tõttu või sihtorgani haaratuse tõttu.

H i s t o p a t o l o o g i l i n e u u r i n g

a) Täielik histopatoloogiline uuring tuleb teha kontrollrühma või suuri annuseid saanud rühma kuulunud loomade normaalsest ja ravitud nahast ja organitest ja kudedest.

b) Uurida tuleb kõiki silmaga nähtavaid lesioone.

([1]) Praegu tuntud kui aspartaadi aminotransferaas.
([2]) Praegu tuntud kui alaniini aminotransferaas.

▼B

c) Teiste annustega rühmades tuleb uurida sihtorganeid.

d) Kui kasutatakse rotte, tuleks väikese ja keskmise annuse rühmadesse kuuluvatel loomadel teostada kopsude histopatoloogilised uuringud infektsioonitunnuste suhtes, sest sel viisil on mugav hinnata loomade tervislikku seisundit. Edasisi histopatoloogilisi uuringuid ei pruugi nendesse rühmadesse kuuluvatel loomadel rutiinselt vaja olla, kuid need tuleb igal juhul teostada organitel, kus suurte annuste kasutamisel täheldati lesioonide teket.

e) Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogilised uuringud teha nendel organitel, mis ravi saanutel kahjustusid.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks võtta kokku tabelis, näidates iga katsegrupi puhul ära loomade arvu uuringu alguses, nende loomade arvu, kellel ilmnes lesioone ja lesioonide tüübid ja iga tüübi protsentuaalse osakaalu. Tulemusi tuleb hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib ükskõik millist tunnustatud statistilist meetodit.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet;

— katsetingimused;

— annused (sealhulgas vehiikel, kui seda kasutatakse) ja kontsentratsioonid;

— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa;

— toime puudumise tase, kui see on võimalik;

— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni;

— toksiliste või muude toimete kirjeldus;

— iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg;

— andmed toidu ja kehakaalu kohta;

— oftalmoloogilised leiud;

— kasutatud hematoloogilised analüüsid ja kõik tulemused;

— kasutatud kliinilise biokeemia analüüsid ja kõik tulemused (sealhulgas kõik uriinianalüüside tulemused);

— lahanguleiud;

▼B

— histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus;

— tulemuste statistiline analüüs, kui see on võimalik;

— tulemuste arutelu;

— tulemuste tõlgendamine.

3.2. HINNANG JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. **VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼M4

B.29. **SUBKROONILINE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 90-PÄEVANE UURING**

KOKKUVÕTE

Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.29 on koostatud uuritava kemikaali mürgisuse täielikuks iseloomustamiseks sissehingamisel subkroonilise ajavahemiku vältel (90 päeva) ning usaldusväärsete andmete saamiseks, et kvantitatiivselt hinnata sissehingamise riski. Kümnest isas- ja kümnest emasloomast koosnevad närilisterühmad viiakse 90 päeva (13 nädala) jooksul kuus tundi päevas kokkupuutesse a) uuritava kemikaaliga kolmel või enamal kontsentratsioonil, b) filtritud õhuga (negatiivne kontrollgrupp) ja/või c) kandeainega (kandeaine kontrollrühm). Loomade kokkupuude toimub üldjuhul viiel päeval nädalas, aga lubatud on ka kokkupuude seitsmel päeval nädalas. Alati katsetatakse nii isas- kui ka emasloomi, aga neid võidakse viia kokkupuutesse erinevate kontsentratsioonidega, kui on teada, et üks sugu on konkreetse uuritava kemikaali suhtes tundlikum. See meetod võimaldab uuringu juhile paindlikkust kaasata satelliitrühmad (pöörduvuse rühmad), surmata vahepeal loomi, teha bronhoalveolaarset lavaaži (BAL), neuroloogiakatseid ning täiendavaid kliinilise patoloogia ja histopatoloogia alaseid hindamisi, et uuritava kemikaali mürgisust paremini iseloomustada.

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 413 (2009). Algne sissehingamisel avalduvat subkroonilist mürgisust käsitlev katsejuhend (katsejuhend nr 413) võeti vastu 1981. aastal (1). Käesolev katsemeetod B.29 (mis on samaväärne katsejuhendi nr 413 läbivaadatud versiooniga (2009)) on ajakohastatud, et võtta arvesse teaduse taset ning rahuldada praegusi ja tulevasi regulatiivseid vajadusi.

2. Sissehingamisel subkroonilise mürgisuse uuringuid kasutatakse peamiselt töökeskkonnas töötajate jaoks tekkiva riski hindamiseks, et õigusaktidega kehtestada lubatud kontsentratsioone. Neid kasutatakse samuti inimeste elamute ja transpordiga seotud riskide ja keskkonnariski hindamiseks. Käesolev meetod võimaldab iseloomustada uuritava kemikaali sissehingamisega toimuval korduval igapäevasel kokkupuutel 90 päeva jooksul (ligikaudu 10 % roti elueast) avaldatavat kahjulikku mõju. Sissehingamisel subkroonilise mürgisuse uuringute andmeid saab kasutada kvantitatiivseks riski hindamiseks ja kroonilise mõju uuringute jaoks kontsentratsioonide valimiseks. Käesolev katsemeetod ei ole spetsiaalselt ette nähtud nanomaterjalide katsetamiseks. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 39 (2).

LÄHTEKAALUTLUSED

3. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et parandada uuringu kvaliteeti ja minimeerida loomade kasutamist. Teave, mis aitab valida katseks sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalis-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta ning muude korduva kokkupuute uuringutega saadud andmed. Kui uuringu puhul eeldatakse neurotoksilisust või täheldatakse uuringus selle olemasolu, võib uuringu juht otsustada teha sellekohased hindamised, näiteks funktsionaalsed vaatluskatsed (*functional observational battery*, FOB) ja motoorse aktiivsuse mõõtmise. Kuigi konkreetsete hindamiste jaoks kokkupuute korraldamise ajastus võib olla kriitilise tähtsusega, ei tohiks kõnealused täiendavad uuringud põhiuuringu kava elluviimist segada.

▼M4

4. Söövitava või ärritava uuritava kemikaali lahjendatud lahuseid võib katsetada kontsentratsioonil, mis annab soovitud mürgisuse määra. Lisateave on avaldatud juhenddokumendis nr 39 (2). Loomade kokkupuutesse viimisel kõnealuste materjalidega peaks sihtkontsentratsioon olema piisavalt väike, et see ei põhjustaks märkimisväärset valu ega kannatusi, kuid piisav, et pikendada kontsentratsiooni-mõju kõver tasemeni, millega saavutatakse katse regulatiivne ja teaduslik eesmärk. Kõnealused kontsentratsioonid tuleks valida juhtumipõhiselt, eelistatavalt asjakohaselt koostatud doosipiirkonna määramise katse alusel, millega saadakse teavet kõige olulisema näitaja, ärrituse ilmnemise lävivääртuse ja aja kohta (vt punktid 11–13). Tuleks esitada kontsentratsiooni valimise põhjendus.

5. Suremas olevad loomad ja loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata. Suremas olevaid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhised prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas OECD juhenddokumendis (3).

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

6. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Eelistatud liigiks on rott. Muu liigi kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

Loomade ettevalmistamine

7. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Randomiseerimise päeval peaksid loomad olema seitsme kuni üheksa nädala vanused noored täiskasvanud. Kehamass ei tohiks erineda rohkem kui ±20 % samast soost loomade keskmisest kehamassist. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks ning hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda.

Pidamistingimused

8. Loomad peaksid olema individuaalselt märgistatud, eelistatult nahaaluse transponderiga, et hõlbustada vaatlusi ja vältida segiajamist. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandeainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuude toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele ülearuseid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise minutimahtu. Kui on kättesaadavad üldandmed, mille kohaselt kõnealuseid muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, ei ole eelnev hoiutoruga kohanemine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokkupuutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisöötasid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatus koguses kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

▼M4

Inhalatsioonikambrid

9. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärki. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu erieesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuude kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhenddokumendis nr 39 (2).

TOKSILISUSE UURINGUD

Piirkontsentratsioonid

10. Erinevalt ägeda mürgisuse uuringutest ei ole sissehingamisel avalduva subkroonilise mürgisuse uuringutel kindlaksmääratud piirkontsentratsioone. Maksimaalse katsetatava kontsentratsiooni valimisel tuleks arvesse võtta järgmist: 1) maksimaalne saavutatav kontsentratsioon, 2) millise kemikaalikontsentratsiooniga võib inimene kokku puutuda halvimal juhul, 3) vajadus säilitada piisav varustatus hapnikuga ja/või 4) loomade heaolu kaalutlused. Kui andmetel põhinevad piirangud puuduvad, võib kasutada määruse (EÜ) nr 1272/2008 (13) ägeda mürgisuse piirmäärasid (st kuni kontsentratsioonini 5 mg/l aerosooli puhul, 20 mg/l auru puhul ja 20 000 ppm gaasi puhul), vt juhenddokument nr 39 (2). Kui kõnealune piirmäär tuleb gaasi või väga lenduva uuritava kemikaali (näiteks külmutusagens) katsetamisel ületada, tuleks seda põhjendada. Piirkontsentratsioonil peaks ilmnema üheselt mõistetav mürgisus, kuid see ei tohiks põhjustada loomadele liigset stressi ega lühendada nende elu (3).

Doosipiirkonna määramise katse

11. Enne põhiuuringu alustamist on tavaliselt vaja teha doosipiirkonna määramise katse. Doosipiirkonna määramise katse on eeluuringust põhjalikum, kuna selles ei piirduta kontsentratsiooni valimisega. Doosipiirkonna määramise katsest saadud teadmistest võib sõltuda põhiuuringu edukus. Doosipiirkonna määramise katses võidakse näiteks saada tehnilist teavet analüüsimeetodite ja osakeste suuruse määramise kohta, teha kindlaks toksilisusmehhanisme, saada kliinilise patoloogia ja histopatoloogia andmeid ning hinnata, milline võib põhiuuringus olla täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) ja minimaalne mürgine kontsentratsioon (MTC). Uuringu juht võib otsustada kasutada doosipiirkonna määramise katset, et määrata kindlaks hingamisteede ärrituse läviväärtus (näiteks hingamisteede histopatoloogia, kopsutalitluse katsete või bronhoalveolaarse lavaaži abil), maksimaalne kontsentratsioon, mille juures loomadele ei tekitata liigset stressi, ja uuritava kemikaali mürgisust kõige paremini iseloomustavad parameetrid.

12. Doosipiirkonna määramise katse võib hõlmata ühte või enamat kontsentratsiooni. Olenevalt valitud näitajatest tuleks kokkupuude iga kontsentratsiooniga korraldada kolmele kuni kuuele isasloomale ja kolmele kuni kuuele emasloomale. Doosipiirkonna määramise katse peaks kestma vähemalt viis päeva ja üldjuhul mitte kauem kui 28 päeva. Põhiuuringu kontsentratsioonide valimise põhjendused tuleks esitada uuringuprotokollis. Põhiuuringu eesmärk on näidata mõju sõltuvust kontsentratsioonist eelduste kohaselt kõige tundlikuma näitaja alusel. Väike kontsentratsioon peaks ideaaljuhul olema täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon ja suur kontsentratsioon peaks näitama üheselt mõistetavat mürgistust, kuid see ei tohiks põhjustada loomadele liigset stressi või lühendada nende elu (3).

▼M4

13. Doosipiirkonna määramise katse jaoks kontsentratsioonide valimisel tuleks arvesse võtta kogu saadaolevat teavet, sh struktuuri-aktiivsuse sõltuvusi ja samalaadseid kemikaale käsitlevaid andmeid (vt punkt 3). Doosipiirkonna määramise katse võib kinnitada mehhanistlike kriteeriumide alusel kõige tundlikumaks peetavaid näitajaid, nagu organofosfaatide põhjustatud koliinesteraasi inhibeerimine, erütrotsütotoksiliste ainete põhjustatud methemoglobiini teke, türoidhormoonid (T_3, T_4) türotoksikantide puhul, valk, laktaatdehüdrogenaas (LDH) või neutrofiilid bronhoalveolaarses lavaažis ohutute vähe lahustuvate osakeste või kopse ärritavate aerosoolide puhul, või need ümber lükata.

Põhiuuring

14. Subkroonilise mürgisuse põhiuuring hõlmab üldjuhul kolme kontsentratsiooni ning vajaduse korral samuti samaaegseid negatiivseid (õhu) ja/või kandeaine kontrollrühmi (vt punkt 18). Asjakohaste kokkupuutetasemete valimisel tuleks kasutada kõiki kättesaadavaid andmeid, sh süsteemse mürgisuse uuringute, metaboliseerimise ja kineetika uuringute tulemusi (eriti tuleks tähelepanu pöörata suure kontsentratsiooni vältimisele, mille puhul kineetilised protsessid küllastatakse). Iga katserühm koosneb kümnest isas- ja kümnest emasloomast (närilised), kes viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse kuueks tunniks päevas viiel päeval nädalas 13 nädala vältel (uuringu kogukestus on vähemalt 90 päeva). Loomad võib viia kokkupuutesse ka seitsmel päeval nädalas (näiteks sissehingatavate ravimite katsetamisel). Kui üks sugu on teatava uuritava kemikaali suhtes teadaolevalt tundlikum, võib eri sugude puhul kasutada kokkupuutel erinevaid kontsentratsioone, et optimeerida mõju kontsentratsioonist sõltuvust, nagu on kirjeldatud punktis 15. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseliigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Päevas vähem kui kuuetunnise kokkupuute kasutamisel või kui on vajalik korraldada pika kestusega (näiteks 22 tundi päevas) kogu keha kaudu kokkupuute uuring, tuleb seda põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Loomi ei tohiks kokkupuute ajal sööta, v.a juhul, kui kokkupuuteperiood ületab kuut tundi. Kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal võib loomadele anda vett.

15. Valitud sihtkontsentratsioonid peaksid võimaldama kindlaks teha sihtorgani(d) ja saada mõju selge sõltuvus kontsentratsioonist.

— Suur kontsentratsioon peaks põhjustama mürgist mõju, kuid ei tohiks põhjustada püsivaid nähte ega surma, mis takistaks usaldusväärset hindamist.

— Keskmine (keskmised) kontsentratsioon(id) peaks(id) olema eraldatud, et esile kutsuda eri tugevusega mürgist mõju väikese ja suure kontsentratsiooni vahemikus.

— Väike kontsentratsioon peaks põhjustama vähe mürgistusnähtusid või olema mõjuta.

Vahepealsed surmamised

16. Kui osa loomi kavandatakse surmata uuringu vältel, tuleks iga kokkupuutetaseme loomade arvu suurendada enne uuringu lõppu surmata plaanitud loomade arvu võrra. Tuleks esitada vahepealsete surmamiste kasutamise põhjendus ja statistilistes analüüsides tuleks neid asjakohaselt arvesse võtta.

▼M4

Satelliituuring (pöörduvuse uuring)

17. Mürgistuse pöörduvuse, püsivuse või viivitusega avaldumise jälgimiseks võidakse korraldada satelliituuring (pöörduvuse uuring) töötlusjärgsel asjakohase pikkusega ajavahemikul, mis ei tohi olla lühem kui 14 päeva. Satelliitrühmades (pöörduvuse rühmades) on kümme isas- ja kümme emaslooma, kellele korraldatakse kokkupuude põhiuuringu katseloomadega samal ajal. Satelliituuringu (pöörduvuse uuringu) rühmad peaksid uuritava kemikaaliga kokku puutuma suurimal kontsentratsioonil ning vajaduse korral tuleks kasutada samaaegseid õhu ja/või kandeaine kontrollrühmi (vt punkt 18).

Loomade kontrollrühm

18. Samaaegse negatiivse (õhu) kontrollrühma loomi tuleks kohelda katserühma loomadega samalaadsel viisil selle erinevusega, et nad viiakse uuritava kemikaali asemel kokkupuutesse filtritud õhuga. Kui katsekeskkonna loomisel kasutatakse vett või muud ainet, tuleks uuringus kasutada negatiivse (õhu) kontrollrühma asemel kandeaine kontrollrühma. Võimaluse korral tuleks kandeainena alati kasutada vett. Kui kandeainena kasutatakse vett, peaks loomade kontrollrühm puutuma kokku sama suhtelise õhuniiskusega õhuga kui katse käigus kokku puutuvad rühmad. Sobiva kandeaine valimine peaks põhinema asjakohasel eeluuringul või varasematel andmetel. Kui kandeaine mürgisus ei ole hästi teada, võib uuringu juht otsustada kasutada nii negatiivset (õhu) kontrollrühma kui ka kandeaine kontrollrühma, kuid see ei ole soovitatav. Kui varasematest andmetest nähtub, et kandeaine ei ole mürgine, ei ole negatiivset (õhu) kontrollrühma vaja ja tuleks kasutada ainult kandeaine kontrollrühma. Kui kandeaines oleva uuritava kemikaali eeluuringust mürgisust ei nähtu, siis võib järeldada, et kandeaine ei ole katsetataval kontsentratsioonil mürgine ja tuleks kasutada selle kandeaine kontrollrühma.

KOKKUPUUTETINGIMUSED

Kontsentratsioonide manustamine

19. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsikalisest vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügroskoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist. Aineosakesi võib osakeste suuruse vähendamiseks mehaaniliselt töödelda. Täpsemad juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

Osakeste suurusjaotus

20. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosoole, mille osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–3 μm ning geomeetriline standardhälve (σ_g) on 1,5–3,0 (4). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdihinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed on kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed ja kiud võivad sätestatud näitajaid ületada.

▼M4

Uuritava kemikaali preparaat kandeaines

21. Ideaaljuhul tuleks uuritavat kemikaali katsetada ilma kandeaineta. Kui kandeaine kasutamine on vajalik sobiva uuritava kemikaali kontsentratsiooni ja osakeste suuruse tekitamiseks, tuleks eelistatavalt kasutada vett. Alati, kui uuritav kemikaal lahustatakse kandeaines, tuleks tõendada uuritava kemikaali stabiilsust.

KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE

Kambri õhuvarustus

22. Kokkupuutekambri õhuvarustust tuleks hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed iga kokkupuute korral vähemalt kord tunnis registreerida. Katsekeskkonna kontsentratsiooni (või ajalise stabiilsuse) reaalajas seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit sissehingamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Kui kontsentratsiooni jälgitakse reaalajas, võib õhuvoogude mõõtmise sageduse vähendada ühele mõõtmisele kokkupuute kohta päevas. Ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldava kambri puhul tuleks eritähelepanu pöörata väljahingatud õhu uuesti sissehingamise vältimisele. Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid norme ei ole võimalik täita, tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisisaldust mõõta. Kui kokkupuute esimese päeva mõõtmistest nähtub, et kõnealuste gaaside sisaldus on nõuetekohasel tasemel, ei peaks edasine mõõtmine olema vajalik.

Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus

23. Kambri temperatuur tuleks hoida 22 ± 3 °C juures. Loomade hingamistsooni suhtelist õhuniiskust nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu toimuva kokkupuute korral tuleks pidevalt seirata ja see tuleks registreerida võimaluse korral üks kord tunnis iga kokkupuute ajal. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatavalt hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu ei pruugi see olla saavutatav (näiteks veepõhise segu uurimisel) või mõõdetav.

Uuritav kemikaal: nimikontsentratsioon

24. Kui see on võimalik, tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambrisüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katsesüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

Uuritav kemikaal: tegelik kontsentratsioon

25. Tegelik kontsentratsioon on inhalatsioonikambris loomade hingamistsoonist võetud proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik saada kas spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetriline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vähelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud

▼M4

konkreetse kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilist analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutuda vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelistatult lenduvas olekus) kordusanalüüse korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase.

26. Võimaluse korral tuleks kogu katse jooksul kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsidest või muud hinnangud. Kuigi uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määratlemise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).

27. Kokkupuutekeskkonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna. Kokkupuutetingimuste stabiilsuse tõendamiseks võib kasutada reaalajas seire seadet, näiteks aerosooli fotomeetrit aerosoolide puhul või süsivesinike kogusisalduse analüsaatorit aurude puhul. Tegelikku kambrikontsentratsiooni tuleks mõõta vähemalt kolm korda iga kokkupuutepäeva jooksul iga kokkupuutekontsentratsiooni kohta. Kui see piiratud õhuvarustuse või väikeste kontsentratsioonide tõttu ei ole võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Ideaaljuhul tuleks kõnealune proov võtta kogu kokkupuuteaja jooksul. Kambrist võetud proovide kontsentratsioon ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui ±10 % gaaside ja aurude puhul või ±20 % vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg (t_{95}) ja see registreerida. Kokkupuute ajavahemik kestab selle aja, kui uuritavat kemikaali lisatakse. Selles võetakse arvesse aega, mis on vajalik kambri tasakaaluseisundi saavutamiseks (t_{95}) ja kontsentratsiooni langemiseks. Juhendid t_{95} hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

28. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskkonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoode või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambris erinevalt. Seepärast tuleks valida vähemalt üks indikaatoraine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, tuleks kirja panna kogu segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

Uuritav kemikaal: osakeste suurusjaotus

29. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt iga nädal iga kontsentratsiooni kohta, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet.

▼M4

30. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada muud seadet, näiteks gravimeetrilist filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kui uuringu varajases etapis on kõikidel uuritavatel kontsentratsioonidel võimalik tõendada võrdväärsust, võib täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest loobuda. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katsest ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik uuringut korrata.

31. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool või kui auru keskkonnas tuvastatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga.

VAATLUSED

32. Loomi tuleks enne kokkupuuteperioodi, selle vältel ja pärast seda kliiniliselt jälgida. Olenevalt loomade reageerimisest kokkupuutele võidakse ette näha sagedasem jälgimine. Kui loomade jälgimist takistab looma hoiutoru, halvasti valgustatud kogukehakamber või läbipaistmatu keskkond, tuleks loomi hoolikalt jälgida pärast kokkupuudet. Enne järgmise päeva kokkupuudet toimuva jälgimise abil on võimalik hinnata mürgise mõju pöörduvust või süvenemist.

33. Kõik vaatlusandmed registreeritakse iga looma kohta eraldi. Kui loomad surmatakse humaansetel kaalutlustel või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

34. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade, limaskestade, hingamis-, vereringe- ja närvisüsteemi muutusi, samuti somatomotoorse aktiivsuse ja käitumismustri muutusi. Tähelepanu peaks olema suunatud värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma kindlakstegemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega. Uuringusse võib lisada täiendavaid hindamisi, nagu kineetika, bioseire, kopsutalitlus, kopsukudedesse kogunevate vähe lahustuvate materjalide püsivus ja käitumismuutused.

KEHAMASS

35. Iga looma kehamass tuleks registreerida natuke enne esimest kokkupuudet (päev 0) ja seejärel kaks korda nädalas (näiteks reedeti ja esmaspäeviti, et tõendada taastumist ilma kokkupuuteta nädalavahetuse jooksul, või pärast ajavahemikku, mis võimaldab süsteemse mürgisuse hindamist) ning pärast surma või eutanaasiat. Kui esimese nelja nädala jooksul nähtusid ei ilmne, võib ülejäänud uuringu vältel mõõta kehamassi kord nädalas. Satelliitrühma (pöörduvuse rühma) loomade (kui neid kasutatakse) kaalumist tuleks jätkata iga nädal kogu taastumisperioodi vältel. Uuringu lõpetamisel tuleks iga looma veidi enne surmamist kaaluda, et võimaldada organite ja kehamassi suhte täpset arvutamist.

SÖÖDA JA VEE TARBIMINE

36. Sööda tarbimist tuleks mõõta iga nädal. Samuti võib mõõta vee tarbimist.

▼M4

KLIINILINE PATOLOOGIA

37. Kliinilise patoloogia hindamised tuleks teha igale loomale, sh kontrollrühma ja satelliitrühma (pöörduvuse rühma) loomadele, kui nad surmatakse. Kokkupuute lõpetamise ja vereproovide võtmise vaheline ajavahemik tuleks registreerida, eriti kui kõnealuse näitaja taastumine on kiire. Plasmast kiiresti kaduvate indikaatorainete (näiteks COHb, CHE ja MetHb) määramiseks tuleb proov võtta kohe pärast kokkupuute lõppu.

38. Tabelis 1 on loetletud kliinilised patoloogilised parameetrid, mida nõutakse üldjuhul kõigi toksikoloogiliste uuringute puhul. Uriinianalüüs ei ole alati vajalik; selle võib teha, kui seda oodatava või ilmnenud toksilisuse tõttu peetakse kasulikuks. Uuringu juht võib uuritava kemikaali mürgisuse paremaks iseloomustamiseks otsustada hinnata täiendavaid parameetreid (näiteks koliinesteraas, lipiidid, hormoonid, happe-aluse tasakaal, methemoglobiin või Heinzi kehakesed, kreatiinkinaas, müeloidi/erütroidi suhe, troponiinid, arteriaalse vere gaasid, laktaatdehüdrogenaas, sorbitooldehüdrogenaas, glutamaatdehüdrogenaas ja γ-glutamüül-transpeptidaas).

Tabel 1

Standardsed kliinilise patoloogia parameetrid

Hematoloogia	
Erütrotsüütide arv	Leukotsüütide koguarv
Hematokrit	Diferentseeritud leukotsüütide arv
Hemoglobiini kontsentratsioon	Trombotsüütide arv
Hemoglobiini keskmine kogus erütrotsüüdis (MCH)	Hüübimisvõime (valige üks): — protrombiini aeg — hüübimisaeg — osalise tromboplastiini aeg
Keskmine erütrotsüüdi maht (MCV)	
Hemoglobiini keskmine kontsentratsioon erütrotsüüdis	
Retikulotsüüdid	
Kliiniline keemia	
Glükoos (*)	Alaniinaminotransferaas
Üldkolesterool	Aspartaataminotransferaas
Triglütseriidid	Leeliseline fosfataas
Vere karbamiidlämmastik	Kaalium
Üldbilirubiin	Naatrium
Kreatiniin	Kaltsium
Üldvalk	Fosfor
Albumiin	Kloriid
Globuliin	
Uriinianalüüs (valikuline)	
Välimus (värvus ja hägusus)	Üldvalk
Kogus	Glükoos
Suhteline tihedus või osmolaalsus	Veri/vererakud
pH	

(*) Kuna pikaajaline nälgimine võib põhjustada glükoosi mõõtmistulemuste erinevust katserühma ja kontrollrühma loomade vahel, peaks uuringu juht otsustama, kas loomade söögita jätmine on asjakohane. Kui loomad jäetakse söögita, peaks ajavahemik olema vastav kasutatavale liigile; roti puhul võib see ajavahemik olla 16 tundi (nälgimine öö jooksul). Paastuglükoosi võib määrata pärast öist nälgimist viimasel kokkupuutenädalal või pärast öist nälgimist enne lahkamist (viimasel juhul määratakse paastuglükoos koos kõigi muude kliinilise patoloogia näitajatega).

▼M4

39. Kui on tõendeid, et peamine kogunemise ja säilitamise piirkond on madalamad hingamisteed (s.o alveoolid), võib oletatava annuse-mõju seose parameetrite kvantitatiivseks hindamiseks kasutada bronho-alveolaarset lavaaži, keskendudes alveoliidile, kopsukoe põletikule ja fosfolipidoosile. See võimaldab asjakohaselt kontrollida alveolaarse kahjustuse puhul esinevat doosi-toime seost ning toime sõltuvust ajast. Bronhoalveolaarse lavaaži vedelikku võib analüüsida leukotsüütide üldarvu ja diferentseeritud leukotsüüdiarvude, üldvalgu ja laktaatdehüdrogenaasi määramiseks. Veel võib kaaluda lüsosoomide kahjustust, fosfolipidoosi, fibroosi ning ärritus- või allergilist põletikku tõendavate näitajate määramist, selleks võib määrata ka põletikuaineid tsütokiine/kemokiine. Bronhoalveolaarse lavaaži mõõtmised üldiselt täiendavad histopatoloogiliste uuringute tulemusi, kuid ei saa neid asendada. Kopsude lavaaži tegemise juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

OFTALMOLOOGILINE LÄBIVAATUS

40. Enne uuritava kemikaali manustamist tuleks kõikide loomade ning katse lõpetamisel kõikide suure kontsentratsiooni ja kontrollrühmade loomade puhul teha oftalmoskoobi või samaväärse seadme abil silmapõhja, valgust murdvate keskkondade, iirise ja sidekestade oftalmoloogilised uuringud. Kui silmas tuvastatakse muutusi, tuleks uurida kõiki muude rühmade (sh satelliitrühma (pöörduvuse rühma)) loomi.

MAKROPATOLOOGIA JA ORGANITE MASS

41. Kõik katseloomad (kaasa arvatud katse käigus surnud, humaansel viisil surmatud või uuringust looma heaolu tagamiseks kõrvaldatud loomad) tuleks (võimaluse korral) täielikult veretustada ja täielikult lahata. Iga looma viimase kokkupuute lõpu ja surmamise vaheline ajavahemik tuleks registreerida. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritähelepanu hingamisteede mis tahes muutustele.

42. Tabelis 2 on loetletud organid ja koed, mis täieliku lahkamise ajal tuleks sobivas keskkonnas säilitada histopatoloogia uuringu jaoks. [Nurksulgudes esitatud] organite ja kudede ning muude organite ja kudede säilitamise otsustab uuringu juht. **Paksus kirjas esitatud** organid tuleb välja puhastada ja kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Kilpnääret ja munandimanuseid tuleks kaaluda ainult vajaduse korral, kuna nende väljapuhastamisel tekkivad moonutused võivad takistada histopatoloogilist hindamist. Koed ja organid tuleks paigutada 10 % puhverdatud formaliini või muusse sobivasse fikseerivasse ainesse vahetult pärast lahkamist ja mitte vähem kui 24–48 tundi enne väljapuhastamist, olenevalt kasutatavast fikseerivast ainest.

▼M4

Tabel 2

Täieliku lahkamise juures säilitatavad organid ja koed

Neerupealised	Söögitoru
Aort	[Haistmissibul]
Luuüdi (ja/või värske aspiraat)	**Munasarjad**
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/ajusild)	Kõhunääre
Umbsool	Kõrvalkilpnäärmed
Käärsool	Perifeerne närv (istmiku- või sääreluu närv, eelistatavalt lihase lähedal)
Kaksteistsõrmiksool	Ajuripats
[**Munandimanused**]	Eesnääre
[Silmad (võrkkest, nägemisnärv) ja silmalaud]	Pärasool
Reieluu ja põlveliiges	Süljenäärmed
Sapipõis (kui see on olemas)	Seemnepõiekesed
[Harderi näärmed]	Nahk
Süda	Seljaaju (kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)
Niudesool	**Põrn**
Tühisool	Rinnak
Neerud	Magu
[Pisaranäärmed (eksorbitaalsed)]	Hambad
Kõri (kolm taset, kaasa arvatud kõripealise põhi)	**Munandid**
Maks	**Harknääre**
Kopsud (kõik ühe tasandi sagarad, sh peamised bronhid)	**Kilpnääre**
Lümfisõlmed kopsu kopsuvärati piirkonnast, eelkõige vähe lahustuvatest osakestest koosneva uuritava kemikaali puhul. Põhjalikuma immunoloogilise suunitlusega vaatluse ja/või uuringu puhul võib kaaluda täiendavate lümfisõlmede säilitamist, näiteks kesksseinandi, kaela/submandibulaarsest ja/või kõrva piirkonnast.	[Keel]
Lümfisõlmed (distaalsed sisenemisavast)	Hingetoru (vähemalt kaks tasandit, sh üks pikisuunaline lõige läbi hingetoruharja ja üks ristlõige)
Piimanääre (emasloomadel)	[Kusejuha]
Lihas (reielihas)	[Kusiti]
Nasofarüngeaalsed koed (vähemalt neljal tasandil; üks tasand peab hõlmama nasofarüngeaalset kanalit ja ninaga seotud lümfikude (NALT)).	Kusepõis
	Emakas
	Sihtorganid
	Kõik nähtavad kahjustused ja massid

▼M4

43. Kopsud tuleks tervena eemaldada, kaaluda ja paigutada sobivasse fikseerivasse ainesse rõhul 20–30 cm veesammast, et tagada kopsude struktuuri säilimine (5). Tuleks koguda ühel tasandil tehtud lõiked kõikidest sagaratest, sh peamistest bronhidest, kuid kui tehakse kopsude lavaaž, tuleks sellest sagarast, millele lavaaži ei tehtud, teha lõiked kolmel tasandil (mitte seeriaviisilised lõiked).

44. Tuleks uurida vähemalt nelja nasofarüngeaalsete kudede tasandit, millest üks peaks hõlmama nasofarüngeaalset kanalit (5, 6, 7, 8, 9), et võimaldada asjakohaselt uurida skvamoosrakulist, üleminekuepiteeli (hingamisteede *clara*-rakud), hingamisteede (ripsepiteel) ja olfaktoorset epiteeli ning neid dreenivat lümfikude (NALT) (10, 11). Tuleks uurida kõri kolme tasandit ja üks neist tasanditest peaks hõlmama kõripealise põhja (12). Tuleks uurida vähemalt kahte hingetoru tasandit, sh ühte pikisuunalist lõiget läbi peabronhide bifurkatsiooni harja ja ühte ristlõiget.

HISTOPATOLOOGIA

45. Kontrollrühma ja suure kontsentratsiooni rühma ning kõigi loomade puhul, kes uuringu jooksul surevad või surmatakse, tuleks teha kõigi tabelis 2 loetletud organite ja kudede histopatoloogiline hindamine. Eritähelepanu tuleks pöörata hingamisteedele, sihtorganitele ja nähtavatele kahjustustele. Organeid ja kudesid, milles suure kontsentratsiooni rühma isenditel leiti kahjustusi, tuleks uurida kõigi rühmade isenditel. Uuringu juht võib otsustada teha histopatoloogilised hindamised täiendavate rühmade puhul, et tõendada selget sõltuvust kontsentratsioonist. Kui kasutatakse satelliitrühma (pöörduvuse rühma), tuleks teha kõigi selliste kudede ja organite histopatoloogiline hindamine, milles katserühmade indiviididel leiti muutusi. Kui suure kokkupuute rühmas sureb liiga palju loomi varajases etapis või tekib muid probleeme, mis muudavad andmete tähenduse ähmaseks, tuleks histopatoloogiliselt uurida järgmise väiksema kontsentratsiooni rühma. Tuleks püüda omavahel seostada üldisi tähelepanekuid ja mikroskoopilisi leide.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

46. Iga looma kohta tuleks esitada kehamassi, sööda tarbimise, kliinilise patoloogia, üldpatoloogia, organite massi ja histopatoloogia andmed. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguleiud. Kõiki tulemusi, nii kvantitatiivseid andmeid kui ka üksiktähelepanekuid, tuleks sobiva statistilise meetodi abil hinnata. Võib kasutada kõiki üldtunnustatud statistilisi meetodeid; statistilised meetodid tuleks valida juba uuringu kavandamisel.

Katseprotokoll

47. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseloomad ja pidamistingimused

— Puuritingimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline õhuniiskus, valgustusperiood ja sööt.

▼**M4**

— Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus. Võib esitada lähteandmed ja varasemad andmed, kui need on saadud loomade kohta, kes viidi kemikaaliga kokkupuutesse samasugustes kokkupuute-, pidamis- ja nälgimistingimustes.

— Loomade arv, vanus ja sugu.

— Randomiseerimismeetod.

— Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

Uuritav kemikaal

— Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).

— Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

Kandeaine

— Kandeaine kasutamise põhjendus ja kandeaine valiku põhjendus (kui kandeainena ei kasutata vett).

— Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

Inhalatsioonikamber

— Inhalatsioonikambri üksikasjalik kirjeldus, sh selle mahu andmed ja joonis.

— Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.

— Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.

— Õhuallikas ja õhu konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.

— Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kaliibrimisel kasutatud meetodid.

— Rõhuvahe (positiivne või negatiivne).

— Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine kambris (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Katsekeskkonna (atmosfääri) stabiilsus.

— Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonnast proovide võtmine kambris.

— Sissejuhitud ja väljatõmmatud õhu töötlemine.

— Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuutepordi kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg (t_{95}).

— Kogu kambris oleva õhu vahetuste arv tunnis.

— Mõõteseadmed (vajaduse korral).

Andmed kokkupuute kohta

— Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.

▼**M4**

— Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambrisse suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).

— Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsoonist kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse iga faasi eraldi analüüsida.

— Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikutena (mg/l, mg/m^3 jne), mitte mahuühikutena (ppm, ppb jne).

— Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetriline standardhälve (σ_g) ning nende arvutamise meetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

Katsetingimused

— Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed mis tahes meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks.

— Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).

— Kambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoo jälgimiseks kasutatud seadmete üksikasjad (st kalibreerimiskõvera koostamine).

— Kambrikontsentratsiooni ja osakeste suurusjaotuse määramise proovide kogumise seadmete andmed.

— Kasutatud keemilise analüüsi meetodi ja selle valideerimise üksikasjad (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsimisel).

— Loomade katse- ja kontrollrühma määramiseks kasutatud randomiseerimismeetod.

— Üksikandmed sööda ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas).

— Katsekontsentratsioonide valiku põhjendus.

Tulemused

— Tabelid katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.

— Tabelid kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni andmete kohta.

— Tabelid osakeste suurusjaotuse andmete kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja σ_g arvutamine.

— Tabelid iga looma reageerimise ja kontsentratsioonide andmete kohta (st mürgistusnähtudega loomad, kaasa arvatud surnud loomad, mõjude laad, raskus, ilmumise aeg ja kestus).

▼M4

— Tabel iga katselooma kehamassi kohta.

— Tabelid sööda tarbimise kohta.

— Tabelid kliinilise patoloogia andmete kohta.

— Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine

— Eritähelepanu tuleks pöörata selliste meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.

— Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda küsimust, kas osakeste suurus oli sobiv sissehingamiseks, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.

— Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõlalisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.

— Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).

— Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (3) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaansel viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.

— Tuleks kindlaks teha sihtorgan(id).

— Tuleks määrata kindlaks täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) ja väikseim täheldatavat kahjulikku toimet avaldav kontsentratsioon (LOAEL).

KIRJANDUS

1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229–258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼**M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4

B.30. KROONILISE MÜRGISUSE UURINGUD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 452 (2009). Esialgne katsejuhend TG 452 võeti vastu 1981. aastal. Käesoleva läbivaadatud katsemeetodi B.30 koostamist peeti vajalikuks, et võtta arvesse hiljutist arengut loomade heaolu ja regulatiivsete nõuete valdkonnas (1, 2, 3, 4). Katsemeetodit B.30 on ajakohastatud paralleelselt käesoleva lisa peatüki B.32 („Kantserogeensuse uuringud") ja peatüki B.33 („Kombineeritud kroonilise mürgisuse/kantserogeensuse uuringud") läbivaatamisega selleks, et saada uuringus kasutatavate loomade abil lisateavet ning esitada täpsemaid andmeid dooside valiku kohta. Käesolev katsemeetod on koostatud selleks, et kasutada seda mitmesuguste kemikaalide, sh pestitsiidide ja tööstuslike kemikaalide katsetamiseks.

2. Enamik kroonilise mürgisuse uuringuid tehakse näriliseliikidega ja käesolev katsemeetod on seega kavandatud peamiselt kasutamiseks nende liikidega tehtavate uuringute puhul. Kui selliseid uuringuid on vaja teha mittenärilistega, võib samuti rakendada käesolevas katsemeetodis kirjeldatud põhimõtteid ja menetlusi koos põhimõtete ja menetlustega, mida on kirjeldatud käesoleva lisa peatükis B.27 („Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenäriliste puhul") (5) koos asjakohaste muudatustega, nagu on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 116, mis käsitleb kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute kavandamist ja teostamist (6).

3. Kroonilise mürgisuse uuringutes kasutatavad kolm peamist manustamisteed on suukaudne, nahakaudne ja sissehingamise teel manustamine. Manustamisviisi valik sõltub uuritava kemikaali füüsikalistest ja keemilistest omadustest ning inimeste peamisest võimalikust ainega kokkupuutumise viisist. Lisateave kokkupuutetee valimise kohta on esitatud OECD juhenddokumendis nr 116 (6).

4. Käesolevas katsemeetodis on keskendutud suukaudsele manustamisele, mis on kroonilise mürgisuse uuringutes enim kasutatav manustamistee. Kuigi inimeste tervist ohustavate riskide hindamiseks võivad vajalikud olla ka pikaajalised kroonilise mürgisuse uuringud, mis hõlmavad nahakaudset või sissehingamise teel toimuvat kokkupuudet, ja/või neid võidakse nõuda teatavate eeskirjadega, on mõlema nimetatud kokkupuutetee puhul katsete korraldamine tehniliselt keeruline. Kõnealused uuringud tuleb kavandada juhtumipõhiselt, kuigi siin suukaudse manustamise kroonilise mürgisuse hindamiseks kirjeldatud katsemeetodi võib võtta aluseks sissehingamise teel ja/või nahakaudse manustamise uuringu katse-eeskirja koostamisel ja arvestades manustamise ajavahemikke, kliinilisi ja patoloogilisi parameetreid jne käsitlevaid soovitusi. On olemas OECD juhenddokumendid uuritava kemikaali sissehingamise teel (6, 7) ja nahakaudselt (6) manustamise kohta. Kui kavandatakse sissehingamise teel toimuvat kokkupuudet hõlmavaid pikaajalisi uuringuid, tuleks eelkõige vaadata käesoleva lisa peatükke B.8 (8) ja B.29 (9) koos sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse uurimist käsitleva OECD juhenddokumendiga (7). Nahakaudse manustamise katsete tegemisel tuleks vaadata käesoleva lisa peatükki B.9 (10).

▼M4

5. Kroonilise mürgisuse uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral kasutatava liigi eluea märkimisväärse osa jooksul. Uuringuga saadakse teavet uuritava kemikaali mürgiste mõjude kohta, tehakse kindlaks sihtorganid ja kemikaali akumulatsiooni võimalikkus. Uuringuga võib ka hinnata täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsiooni, mida võib kasutada inimeste kokkupuute jaoks ohutuskriteeriumide kehtestamiseks. Samuti rõhutatakse vajadust teha loomade hoolikas kliiniline läbivaatus, et hankida võimalikult palju teavet.

6. Käesoleva katsemeetodi kohaste uuringute eesmärgid on järgmised:

— uuritava kemikaali kroonilise mürgisuse kindlaksmääramine;

— sihtorganite tuvastamine;

— mõju doosist sõltuvuse kirjeldamine;

— täheldatava kahjuliku toimeta doositaseme (*no-observed-adverse-effect level*, NOAEL) või võrdlusdoosi (*Benchmark Dose*, BMD) kindlakstegemiseks lähtepunkti määramine;

— kroonilise mürgise mõju prognoosimine inimeste kokkupuutetasemetel;

— andmete saamine toimeviisi käsitlevate hüpoteeside kontrollimiseks (6).

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Uuritava kemikaali toksikoloogiliste omaduste hindamisel peaks uurimislabor enne uuringu tegemist võtma arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et uuringu kavandamisel keskenduda kroonilise toksilisuse võimaluse kõige tõhusamale katsetamisele ja minimeerida loomade kasutamine. Uuringu kavandamist hõlbustav teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalis-keemilised omadused; mis tahes teave toimeviisi kohta; *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatav/eeldatavad kasutusvaldkond/-valdkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; samalaadse struktuuriga ainete kohta olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed; olemasolevad toksiko-kineetilised andmed (võimaluse korral ühekordse doosi ja korduvdoosi kineetika) ning muude korduva kokkupuute uuringute käigus saadud andmed. Kroonilist mürgisust tuleks uurida alles pärast esialgse mürgisust käsitleva teabe saamist korduvdoosi 28-päevasest ja/või 90-päevasest mürgisuse katsest. Konkreetse uuritava kemikaali võimalike kahjulike tervisemõjude üldhindamisel tuleks kaaluda kroonilise mürgisuse järkjärgulise uurimise lähenemisviisi (11, 12, 13, 14).

8. Enne uuringu alustamist tuleks uuringu kava ja eesmärkide alusel kindlaks määrata kõige sobivamad tulemuste analüüsi statistilised meetodid. Tuleb kaaluda ka seda, kas statistikas tuleks arvestada ellujäämise parandust ja analüüsi tegemist sel juhul, kui üks või mitu rühma tuleb enneaegselt surmata. Suunised asjakohaste statistiliste analüüside tegemiseks ja peamised viited rahvusvaheliselt tunnustatud statistilistele meetoditele on esitatud juhenddokumentides nr 116 (6) ning nr 35, milles käsitletakse kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute analüüsi ja hindamist (15).

▼M4

9. Kroonilise mürgisuse uuringu tegemisel tuleks alati järgida suunispõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 19 kliiniliste nähtude tuvastamise, hindamise ja kasutamise kohta ohutuse hindamisel kasutatavate katseloomade humaansete lõpetamiskriteeriumidena (16) ja eelkõige selle punktis 62. Kõnealuses punktis on sätestatud, et „[k]ui uuringutes, milles kasutatakse korduvat annustamist, tekivad loomal kliinilised progresseeruvad nähud, mis põhjustavad tema seisundi halvenemise, tuleb teha andmetel põhinev otsus, kas loom tuleks humaansel viisil surmata. Otsuse tegemisel tuleks kaaluda kõnealuse uuringus osaleva looma jätkuvast elushoidmisest saadava teabe väärtust võrreldes looma üldise seisundiga. Kui tehakse otsus kõnealune loom katsesse jätta, siis tuleks vajaduse korral suurendada vaatluste sagedust. Ilma katse eesmärki kahjulikult mõjutamata võib samuti olla võimalik annustamise ajutine peatamine, kui see vähendab looma valu või kannatusi, või katsedoosi vähendamine.”

10. Üksikasjalikke suuniseid ja arutelu kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute doosi valimise põhimõtete kohta on võimalik leida juhenddokumendist nr 116 (6) ning samuti kahest rahvusvahelise bioteaduste instituudi väljaandest (17, 18). Doosi valimise strateegia sõltub põhiliselt uuringu peamisest eesmärgist või peamistest eesmärkidest (punkt 6). Sobivate doositasemete valimisel tuleks saavutada tasakaal ühelt poolt ohu sõeluuringute ja teiselt poolt väikese doosi mõju iseloomustamise ning doosi ja mõju vahelise seose kindlakstegemise vahel. See on eriti oluline juhul, kui tehakse kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuring (käesoleva lisa peatükk B.33; punkt 11).

11. Tuleks kaaluda eraldi kroonilise mürgisuse uuringu (käesolev katsemeetod B.30) ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.32) tegemise asemel kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.33) tegemist. Kombineeritud katse võimaldab kokku hoida aega ja kulusid, võrreldes kahe eraldi uuringu tegemisega, kuid annab samasuguse kvaliteediga andmed nii kroonilise mürgisuse kui ka kantserogeensuse kohta. Kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.33) tegemisel tuleks siiski hoolikalt kaaluda doosi valimise põhimõtteid (punktid 9 ja 20–25) ning tuleb ka arvestada, et mõnikord nõutakse eraldi uuringute tegemist eeskirjadega.

12. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 116 (6).

KATSE PÕHIMÕTE

13. Uuritavat kemikaali manustatakse iga päev astmeliselt suurenevate doosidena mitmele katseloomade rühmale üldjuhul 12 kuu vältel, kuigi regulatiivsetest nõuetest olenevalt võib katse kestus olla ka pikem või lühem (vt punkt 33). Katse selline kestus tagab, et see on piisavalt pikk kumulatiivse mürgisuse mõjude avaldumiseks, kuid tulemusi ei hakka veel segama geriaatrilised muutused. Kõrvalekaldeid 12-kuulisest kokkupuute kestusest tuleks põhjendada, eelkõige lühema kestuse puhul. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu, kuigi ka sissehingamise või nahakaudse kokkupuute uurimine võib olla sobiv. Uuringu kavaga võib ette näha ühe või mitu vahepealset surmamist, näiteks kolme ja kuue kuu möödudes, ja selle võimaldamiseks võib kasutada täiendavaid loomarühmi (vt punkt 19). Manustamisperioodi jooksul vaadeldakse loomi põhjalikult toksilisuse märkide tuvastamiseks. Katse ajal surnud või tapetud loomad lahatakse ning katse lõppemisel tapetakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

▼M4

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

14. See katsemeetod hõlmab kroonilise mürgisuse hindamist peamiselt näriliste puhul (vt punkt 2), kuigi tuleb arvestada, et mõnikord võidakse eeskirjadega nõuda samalaadsete katsete tegemist muude loomadega kui närilised. Liigi valikut tuleks põhjendada. Kui nõutakse kroonilise mürgisuse uuringut muu liigiga kui närilised, peaks selle kavandamine ja tegemine toetuma põhimõtetele, mis on esitatud käesolevas katsemeetodis ja käesoleva lisa peatükis B.27 („Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenäriliste puhul") (5). Lisateave liigi ja aretusliini valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (6).

15. Käesoleva katsemeetodi puhul on eelistatud näriliseliik rott, kuigi kasutada võib ka muid närilisi, nt hiiri. Rotid ja hiired on olnud eelistatud katsemudelid tänu nende suhteliselt lühikesele elueale, laialdasele kasutamisele farmakoloogia- ja toksikoloogiauuringutes, võimalusele kutsuda neil kergesti esile kasvajaid ja tänu piisavalt iseloomustatud liinide kättesaadavusele. Nende omaduste tulemusena on olemas palju teavet nende füsioloogia ja patoloogia kohta. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Kroonilise mürgisuse uuring tuleks teha loomadega, kes on samast liinist ja sama päritoluga kui loomad, keda kasutati lühema kestusega esialgses mürgisuse kindlakstegemise uuringus. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined.

Pidamis- ja söötmistingimused

16. Loomi võib hoida eraldi või väikestes samast soost loomade rühmades; eraldi pidamist tuleks kaaluda ainult juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud (19, 20, 21). Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (±3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Sööt peaks vastama kõigile uuritava liigi toitumisvajadustele ja sööda saasteainesisaldus, sh pestitsiidijäägid, püsivad orgaanilised saasteained, fütoöstrogeenid, raskmetallid ja mükotoksiinid, mis võivad mõjutada katse tulemusi, peaks olema võimalikult väike. Regulaarselt tuleks analüüsida sööda toitainete ja saasteainete sisaldust; vähemalt tuleks seda teha uuringu alguses ja siis, kui hakatakse kasutama uut söödapartiid, ning analüüside tulemused tuleks esitada lõpparuandes. Samuti tuleks esitada uuringus kasutatud joogivee analüüsi andmed. Sööda valikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali jaoks sobiv segu ja rahuldada loomade toitumisvajadused, kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga.

Loomade ettevalmistamine

17. Kasutada tuleks terveid loomi, kes on labororitingimustega vähemalt seitsme päeva jooksul kohanenud ning keda ei ole varem uuringutes kasutatud. Näriliste korral tuleks loomadele uuritava kemikaali annustamist alustada võimalikult varakult pärast võõrutamist ja kohanemist ning eelistatavalt enne, kui loomad on kaheksa nädala vanused. Katseloomi tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Uuringu alguses peaks kummagi soo loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ja kõrvalekalle ei tohiks ületada 20 % uuringus kasutatavate loomade keskmisest kehamassist, mis leitakse eraldi kummagi soo loomade jaoks. Loomad

▼M4

tuleks kontroll- ja katserühmadesse jaotada juhuslikkuse alusel. Pärast juhuslikkuse alusel jaotamist ei tohiks rühmades kummagi soo keskmised kehamassid oluliselt erineda. Kui erinevused on statistiliselt olulised, tuleks juhuslikkuse alusel jaotamise etappi võimaluse korral korrata. Igale loomale tuleks määrata ainuline tunnusnumber ja loom tuleks kõnealuse numbriga püsivalt märgistada tätoveerimise, mikrokiibi paigaldamise või muu sobiva meetodi abil.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

18. Tuleks kasutada mõlemat sugu. Tuleks kasutada piisavalt palju loomi, et uuringu lõpus oleks igas rühmas küllalt loomi põhjalikuks bioloogiliseks ja statistiliseks hindamiseks. Näriliste puhul tuleks tavaliselt igas doositaseme rühmas kasutada vähemalt 20 looma kummastki soost ning mittenäriliste puhul on rühmas soovitatav kasutada vähemalt nelja looma kummastki soost. Hiirtega tehtavates uuringutes võib olla vajalik kasutada igas doositaseme rühmas rohkem loomi, et teha kõik nõutavad hematoloogilised analüüsid.

Loomade vahepealne surmamine, satelliitrühmad ja kontroll-loomad

19. Kui see on teaduslikult põhjendatud, võib uuringus ette näha vahepealsed surmamised (vähemalt kümme looma kummagi soo ja iga doosirühma kohta), näiteks kuue kuu möödumisel, et saada teavet toksikoloogiliste muutuste arengu kohta ja toimemehhanismi kohta. Kui selline teave on uuritava kemikaaliga tehtud varasematest korduvdoosi mürgisuse uuringutest juba olemas, ei pruugi vahepealsed surmamised olla teaduslikult põhjendatud. Samuti võib kaasata satelliitrühmi, et jälgida uuritava kemikaali põhjustatud toksikoloogiliste muutuste pöörduvust; nende puhul kasutatakse üldjuhul uuringu kõrgeimat doseerimistaset ja kontrollrühma. Vajaduse korral võib uuringu vältel lisada haigusseisundi seireks ka täiendava kontroll-loomade rühma (üldjuhul viis looma kummastki soost) (22). Kui kavandatakse vahepealseid surmamisi või satelliit- või kontroll-loomade rühmade kasutamist, tuleks uuringuprojekti kaasatud loomade arvu suurendada nende loomade arvu võrra, kes kavatsetakse enne uuringu lõppu surmata. Selliste loomade puhul tuleks üldjuhul teha samad vaatlused, sh kehamassi ja sööda/vee tarbimise mõõtmised, hematoloogilised ja kliinilise biokeemia mõõtmised ning patoloogiauuringud, kui põhiuuringu kroonilise mürgisuse etapi loomade puhul, kuigi võib ka otsustada, et vahepealse surmamise rühmade puhul piirdutakse konkreetsete peamiste näitajate, näiteks neurotoksilisuse või immunotoksilisuse mõõtmisega.

Doosirühmad ja doseerimine

20. Juhendid kõigi doosi valiku ja doositaseme intervallidega seotud asjaolude kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (6). Uuringus tuleb kasutada vähemalt kolme doositaset ja uuringuga samal ajal peab tegema ka kontrolli, välja arvatud siis, kui tehakse piirsisalduskatse (vt punkt 27). Doositasemed põhinevad üldjuhul lühema ajavahemiku korduvdoosi või doosipiirkonna määramise katse tulemustel ja nende puhul tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali või samalaadsete kemikaalide kohta olemasolevat toksikoloogia- ja toksikokineetikaalast teavet.

▼M4

21. Kui uuritava kemikaali füüsikalis-keemilised omadused või bioloogiline mõju seda ei piira, peaks kõrgeim doositase olema üldiselt valitud nii, et saaks määrata kindlaks peamised sihtorganid ja toksilise toime, põhjustamata siiski kannatusi, ägedat mürgisust, haigestumist või surma. Punktis 22 allpool loetletud asjaolusid arvesse võttes tuleks valida kõrgeim doositase, et saada tõendusmaterjali mürgisuse kohta, näiteks kehamassi tõusu vähenemise kaudu (ligikaudu 10 %).

22. Sellest hoolimata võidakse uuringu eesmärkidest olenevalt (vt punkt 6) valida suurim doos, mis jääb allapoole mürgisust tõendavat doosi, näiteks kui doos avaldab teatavat kahjulikku mõju, kuid siiski ei mõjuta eluiga ega kehamassi. Suurim doos ei tohiks ületada 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas (piirdoos, vt punkt 27).

23. Doositaseme ja doositasemete intervalli võib valida nii, et määrata kindlaks mõju sõltuvus doosist, täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) või muu soovitud uuringutulemus, näiteks võrdlusdoos (BMD) (vt punkt 25) madalaimal doositasemel. Asjaolud, mida tuleks väiksemate dooside valimisel arvesse võtta, on toime doosist sõltuvuse eeldatav suurenemine, doosid, mis võivad põhjustada olulisi metaboliseerimise muutusi või toksilisuse toimemehhanismi muutumist, kui eeldatakse läviväärtuse olemasolu, või mille puhul eeldatakse väikeste dooside ekstrapoleerimise lähtepunkti olemasolu.

24. Doositasemete vahemik sõltub uuritava kemikaali omadustest ja seda ei saa käesoleva katsemeetodiga ette kirjutada, aga kahe- kuni neljakordne vahemik annab sageli häid katsetulemusi, kui seda kasutatakse alanevate doositasemete määramiseks, ning dooside vahel väga suure (näiteks rohkem kui kuue- kuni kümnekordse) vahemiku kasutamise asemel on sageli parem lisada neljas katserühm. Üldiselt tuleks vältida kümnest suurema kordaja kasutamist ja kui seda tehakse, tuleks seda põhjendada.

25. Nagu juhenddokumendis nr 116 (6) on täpsemalt kirjeldatud, tuleb doosi valimisel arvesse võtta järgmist:

— doosi-toime sõltuvuse teadaolev või oletatav mittelineaarsus või murdepunkt;

— toksikokineetika ja doosipiirkonnad, mille puhul esineb metaboolne induktsioon, küllastumine või väliste ja sisemiste dooside vaheline mittelineaarsus või neid ei esine;

— esmaskahjustused, toimemarkerid või märgid sellest, et tuleb arvesse võtta peamiste bioloogiliste alusprotsesside toimumist;

— peamised (või oletatavad) toimeviisi asjaolud, näiteks annused, mille juures hakkab suurenema tsütotoksilisus, mõjutatakse hormoonitasemeid, homeostaasi säilitamise mehhanismid saavad üle koormatud jne;

— mõju doosist sõltuvuse kõvera piirkonnad, kus on vaja eriti usaldusväärset hinnangut, näiteks eeldatava võrdlusdoosi (BMD) vahemikus või oletatava läviväärtuse juures;

— inimeste kokkupuute eeldatava tasemega seotud kaalutlused.

▼M4

26. Kontrollrühm on rühm, kellega katseid ei tehta, või kandeaine kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet kõige suuremas koguses, mida kasutatakse doosirühmades. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga ja katseloomad söövad seda sööda halvema maitse tõttu oluliselt vähem, võib asjakohasema kontrollrühma tagamiseks olla sobiv täiendav kontrollrühm, kes saab samapalju sööta, kui doosirühmas ära süüakse.

27. Kui eeluuringust saadud teabe alusel võib oletada, et katse ühel doositasemel, mis on võrdväärne päevas vähemalt 1 000 mg-ga kehamassi kg kohta ja mille puhul kasutatakse käesoleva uuringu jaoks kirjeldatud meetodeid, ei põhjusta tõenäoliselt kahjulikku mõju ja kui samalaadse struktuuriga ainete andmete alusel mürgisust ei eeldata, siis ei tarvitse kolme doositaseme kasutamisega täismahus uuring olla vajalik. Võib kasutada piirdoosi 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas, välja arvatud juhul, kui inimese võimalikku kokkupuudet arvestades on vaja kasutada suuremat doositaset.

Dooside ettevalmistamine ja uuritava kemikaali manustamine

28. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu koos sööda või joogiveega või sundsöötmisega. Lisateave manustamisteede ja -meetodite kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (6). Manustamistee ja -meetod sõltub uuringu eesmärgist, uuritava kemikaali füüsikalistest/keemilistest omadustest, biosaadavusest ja inimese uuritava kemikaaliga kokkupuutumise peamisest teest ja viisist. Manustamistee ja -meetodi valikut tuleks põhjendada. Loomade heaolu huvides tuleks suukaudne manustamine sundsöötmisega üldiselt valida ainult selliste ainetega, mille puhul see manustamistee ja -meetod on põhjendatult sarnane inimese võimaliku kokkupuutega kemikaaliga (näiteks ravimid). Toidu- või keskkonnakemikaalide puhul, sh pestitsiidide puhul toimub manustamine tavaliselt sööda või joogivee kaudu. Mõne stsenaariumi puhul, näiteks kokkupuude töökohal, võib olla asjakohasem manustada kemikaali muul viisil.

29. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmisi kandeaine ja muude lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotumisele, metaboliseerimisele või retentsioonile; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi, ning mõjud sööda või vee tarbimisele või loomade toitumusele. On soovitatav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ja siis võimalikku lahust muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul tuleks teada kandeaine mürgiseid omadusi. Tuleks teada uuritava kemikaali stabiilsust ning doseerimislahuste või sööda (nagu on asjakohane) homogeensust manustamise tingimustes (näiteks söödaga).

30. Nende kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Pikas mürgisuse uuringus, kus kemikaali manustatakse sööda kaudu, ei tohiks uuritava kemikaali kontsentratsioon söödas üldiselt olla suurem kui 5 % sööda üldkogusest, et vältida tasakaalustamata toitumist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (mg sööda kg kohta või ppm) või püsivat doositaset looma kehamassi alusel (mg kehamassi kg kohta), mis arvutatakse iga nädal. Tuleks täpsustada, millist võimalust kasutatakse.

▼M4

31. Suukaudse manustamise korral saavad loomad uuritavat kemikaali iga päev (seitse päeva nädalas) üldjuhul 12 kuu vältel (vt ka punkt 33), kuigi regulatiivsetest nõuetest olenevalt võib vaja minna ka pikemat katset. Iga muud doseerimiskava, nt viis päeva nädalas, tuleb põhjendada. Nahakaudse manustamise puhul töödeldakse loomi üldjuhul uuritava kemikaaliga 12 kuu vältel vähemalt kuus tundi päevas seitse päeva nädalas, nagu on sätestatud käesoleva lisa peatükis B.9 (10). Sissehingamise teel toimuv kokkupuude toimub kuus tundi päevas ja seitse päeva nädalas; võib kasutada ka kokkupuudet viiel päeval nädalas, kui see on põhjendatud. Kokkupuuteperiood on üldjuhul 12 kuud. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseliigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Kui päevas kasutatakse alla kuuetunnist kokkupuute kestust, tuleks seda põhjendada. Vt ka käesoleva lisa peatükk B.8 (8).

32. Kui loomadele manustatakse uuritavat kemikaali sundsöötmisega, tuleks seda teha iga päev umbes samal kellaajal maosondi või sobiva intubatsioonikanüüli abil. Üldiselt manustatakse üks annus üks kord päevas; kui aga kemikaal on näiteks lokaalne ärritaja, võib igapäevase doosimäära säilitada, manustades jaotatud annust (kaks korda päevas). Suurim vedelikukogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus peaks olema nii väike kui praktiliselt võimalik ega tohiks üldjuhul näriliste puhul ületada 1 ml kehamassi 100 g kohta (22). Katses kasutatava mahu erinevusi tuleks vähendada miinimumini; püsiva mahu tagamiseks tuleks kõikidel doositasemetel kasutada erinevaid kontsentratsioone. Erandiks on võimaliku söövitava või ärritava mõjuga kemikaalid, mida tuleb tugeva paikse mõju vältimiseks lahjendada. Tuleks vältida katseid kontsentratsioonidel, mis tõenäoliselt võivad seedetrakti söövitada või ärritada.

Uuringu kestus

33. Kuigi käesolev katsemeetod on peamiselt kavandatud kroonilise mürgisuse 12-kuulise uuringuna, võimaldab uuringu kava ka lühema (näiteks kuus või üheksa kuud) või pikema (näiteks 18 või 24 kuud) kestusega uuringuid, olenevalt konkreetsetest eeskirjadest või teatavatest toimemehhanismiga seotud eesmärkidest. Kõrvalekaldeid 12-kuulisest kokkupuute kestusest tuleks põhjendada, eelkõige lühema kestuse puhul. Uuritava kemikaali põhjustatud toksikoloogiliste muutuste pöörduvuse jälgimiseks kasutatavaid satelliitrühmi tuleks pärast kokkupuute lõpetamist hoida ilma annustamiseta vähemalt neli nädalat ja mitte rohkem kui kolmandiku uuringu kogukestusest. Täpsemad juhendid, sh uuringus ellujäämise arvestamise kohta, on esitatud juhenddokumendis nr 116 (6).

VAATLUSED

34. Kõiki loomi tuleks haigestumise või suremise suhtes kontrollida, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, sh nädalavahetustel ja pühadel. Vähemalt üks kord päevas tuleks teha üldine kliiniline läbivaatus, eelistatavalt igal päeval samal ajal / samadel aegadel, arvestades sundsöötmisega manustamise puhul eeldatava mõju kõrgperioodi pärast doseerimist.

▼M4

35. Kõik loomad tuleks üksikasjalikult kliiniliselt läbi vaadata vähemalt kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada iga katselooma seisundi muutumise võrdlusi), uuringu esimese nädala lõpus ja seejärel iga kuu. Vaatlused tuleks korraldada nii, et üksikute vaatlejate vahelised erinevused oleksid minimeeritud ega sõltuks katserühmast. Need vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, eelistatavalt selleks ette nähtud kohas ja iga kord samal ajal. Tulemused tuleks hoolikalt üles märkida, kasutades selleks võimaluse korral katselabori selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et vaatlustingimuste varieeruvus oleks minimaalne. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised tunnused: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestal, eritiste esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus ja muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad endaga ümberkäimisele reageerivad, kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi liikumine) (24).

36. Enne uuritava kemikaali esmakordset manustamist tuleks oftalmoskoobi või muu sobiva seadme abil teha kõikide loomade oftalmoloogiline kontroll. Pärast uuringu lõppu tuleks kõnealune kontroll teha eelistatavalt kõikidele loomadele, kuid vähemalt suure doosi rühma ja kontrollrühma loomadele. Kui silmades avastatakse muutusi, tuleb läbi vaadata kõik loomad. Kui struktuurianalüüs või muu teave viitab mürgisusele silmade suhtes, tuleks silmi kontrollida sagedamini.

37. Kui kemikaali varasem korduvannuse 28-päevane ja/või 90-päevane mürgisuse uuring näitas võimalikku neurotoksilist mõju, võib soovi korral enne uuringu algust ja kolmekuuliste ajavahemike järel pärast uuringu algust kuni 12 kuuni (kaasa arvatud) ning samuti uuringu lõpus (kui uuring kestab kauem kui 12 kuud) uurida erinevat tüüpi stiimulitele (24) (näiteks helilised, visuaalsed ja propriotseptiivsed stiimulid) sensoorset reageerimist (25, 26, 27), hinnata haardetugevust (28) ja motoorset tegevust (29). Võimalike meetodite täpsemad üksikasjad on esitatud vastavates viidetes. Siiski võib kasutada ka muid meetodeid kui need, millele viidatakse.

38. Sellise kemikaali puhul, mille varasem korduvannuse 28-päevane ja/või 90-päevane mürgisuse uuring näitas immunotoksilise mõju võimalikkust, võib soovi korral teha uuringu lõpul kõnealuse näitaja täiendavaid uuringuid.

Kehamass, sööda ja vee tarbimine ning söödakasutuse tõhusus

39. Kõik loomad tuleks kaaluda kemikaali manustamise alguses, vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Sööda tarbimist ja söödakasutuse tõhusust tuleks mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ning seejärel vähemalt kord kuus. Kui kemikaali manustatakse joogiveega, siis tuleks vee tarbimist mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Joogivee tarbimise mõõtmisi tuleks kaaluda ka uuringute puhul, milles muutub loomade joomiskäitumine.

▼M4

Hematoloogia ja kliiniline biokeemia

40. Näriliste uuringutes tuleks hematoloogilised uuringud teha vähemalt kümne isas- ja kümne emasloomaga rühma kohta kolme, kuue ja 12 kuu möödumisel ning samuti uuringu lõpus (kui uuring kestab kauem kui 12 kuud); kõik uuringud tehakse alati samadel loomadel. Hiirte puhul võib kõikide nõutavate hematoloogiliste näitajate määramiseks minna vaja satelliitloomi (vt punkt 18). Muude loomade kui näriliste uurimisel võetakse proovid väiksemalt arvult loomadelt (koerte uurimisel näiteks neljalt loomalt kummagi soo ja iga rühma kohta) vahepealsetel proovivõtu aegadel ja uuringu lõpus, nagu on kirjeldatud näriliste puhul. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu vältel ei tuvastatud mõju hematoloogilistele parameetritele, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha ei näriliste ega muude loomade puhul. Vereproovid tuleks võtta määratud kohast, näiteks otse südamest või retroorbitaalsest siinusest, kasutades tuimestust.

41. Tuleks uurida järgmisi parameetreid (30): leukotsüütide üldarv ja diferentseeritud leukotsüüdiarvud, erütrotsüütide arv, vereliistakute arv, hemoglobiini kontsentratsioon, hematokrit (rakkude protsent vere üldmahus), erütrotsüütide keskmine maht (MCV), hemoglobiini keskmine kogus erütrotsüüdis (MCH), hemoglobiini keskmine kontsentratsioon erütrotsüüdis (MCHC), protrombiini aeg ja aktiveeritud osalise tromboplastiini aeg. Vajaduse korral võib mõõta muid hematoloogiaparameetreid, näiteks Heinzi kehakesi või muid atüüpilisi erütrotsüüdivorme või methemoglobiini, olenevalt uuritava kemikaali mürgisusest. Üldiselt tuleks kasutada paindlikku lähenemisviisi sõltuvalt konkreetse uuritava kemikaali puhul täheldatud ja/või eeldatavast mõjust. Kui uuritav kemikaal mõjutab vereloomesüsteemi, võib olla vajalik uurida samuti retikulotsüütide arvu ja luuüdi tsütoloogiat, kuigi need uuringud ei ole alati vajalikud.

42. Olulise kudesid kahjustava toksilise mõju ning eelkõige neerusid ja maksa kahjustava mõju uurimiseks tehakse kliinilise biokeemia analüüsid vereproovidega, mis on võetud vähemalt kümnelt isas- ja kümnelt emasloomalt rühma kohta samade ajavahemike järel, mis on ette nähtud hematoloogiliste uuringute puhul; proovid võetakse alati samadelt loomadelt. Hiirte puhul võib kõikide nõutavate kliinilise biokeemia näitajate määramiseks minna vaja satelliitloomi. Muude loomade kui näriliste uurimisel võetakse proovid väiksemalt arvult loomadelt (koerte uurimisel näiteks neljalt loomalt kummagi soo ja iga rühma kohta) vahepealsetel proovivõtu aegadel ja uuringu lõpus, nagu on kirjeldatud näriliste puhul. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu vältel ei tuvastatud mõju kliinilise biokeemia parameetritele, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha ei näriliste ega muude loomade puhul. Enne vereproovi võtmist on soovitatav loomi (v.a hiired) öö jooksul näljutada. Tuleks uurida järgmisi parameetreid (30): glükoos, karbamiid (karbamiidlämmastik), kreatiniin, üldvalk, albumiin, kaltsium, naatrium, kaalium, üldkolesterool, vähemalt kaks sobivat hepatotsellulaarse hindamise katset (alaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, glutamaatdehüdrogenaas, sapphapete kogusisaldus) (31) ja vähemalt kaks sobivat hepatobiliaarse hindamise katset (aluseline fosfataas, γ-glutamüültransferaas, 5'-nukleotidaas, üldbilirubiini, sapphapete kogusisaldus) (31). Muid kliinilisi keemilisi parameetreid, näiteks triglütseriide paastutingimustes, teatavaid hormoone ja koliinesteraasi võib mõõta vastavalt vajadusele, olenevalt uuritava kemikaali mürgisusest. Üldiselt on vaja paindlikku lähenemisviisi sõltuvalt uuritava kemikaali täheldatud ja/või oletatavast mõjust.

▼M4

43. Uriinianalüüsi näitajad tuleks määrata vähemalt kümnel isas- ja kümnel emasloomal rühma kohta proovidest, mis on kogutud samade vahemikega kui hematoloogia- ja kliinilise keemia proovid. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu ajal ei leitud uriinianalüüsil mingit mõju, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha. Kliinilise patoloogia uuringute eksperdi soovituse (30) kohaselt tuleks määrata järgmised parameetrid: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, üldvalk ja glükoos. Lisaks võib määrata ketoone, urobilinogeeni, bilirubiini ja peitverd. Kui täheldatud mõju on vaja laialdasemalt uurida, võib vajaduse korral määrata täiendavaid näitajaid.

44. Üldiselt arvatakse, et hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate lähteväärtused on vaja enne kemikaali manustamist määrata koertega tehtavate uuringute puhul, kuid närilistega tehtavate uuringute puhul neid määrata vaja ei ole (30). Kui varem määratud lähteväärtused (vt punkt 50) ei ole õiged, tuleks kaaluda selliste väärtuste määramist.

Patoloogia

Täielik lahkamine

45. Kõik uuringus kasutatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Siiski võib ka ette näha, et mõõtmised piirduvad (vahepeal surmatud või satelliitrühma loomade puhul) kõige olulisemate, näiteks neurotoksilisuse või immunotoksilisuse näitajate määramisega (vt punkt 19). Selliseid loomi ei ole vaja lahata ja nendega teha järgmistes punktides kirjeldatud protseduure. Kontroll-loomade puhul võib uuringu juht konkreetsel juhul otsustada, kas lahkamine on vajalik.

46. Kõikide loomade puhul, v.a loomad, kellele on tehtud erand punkti 45 viimase osa järgi, tuleks määrata organite mass. Kõigi loomade (välja arvatud loomad, kes leitakse suremas ja/või surmatakse uuringu kestel) neerupealised, aju, munandimanused, süda, neerud, maks, munasarjad, põrn, munandid, kilpnääre (mis kaalutakse pärast fikseerimist koos kõrvalkilpnäärmetega) ja emakas tuleks puhastada kõigist nende küljes olevatest kudedest, nagu on asjakohane, ja kaaluda märjalt võimalikult kiiresti pärast lahkamist, et vältida organite kuivamist. Uuringus, kus kasutatakse hiiri, ei ole neerupealiste kaalumine kohustuslik.

47. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 32) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskkonnas (kandilistes sulgudes esitatud organite uuring ei ole kohustuslik):

Kõik silmaga nähtavad kahjustused	Süda	Kõhunääre	Magu (eesmagu, mao näärmeline osa)
Neerupealised	Niudesool	Kõrvalkilpnääre	[Hambad]
Aort	Tühisool	Perifeerne närv	Munandid
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/ajusild)	Neerud	Ajuripats	Harknääre
Umbsool	Pisaranääre (eksorbitaalne)	Eesnääre	Kilpnääre
Emakakael	Maks	Pärasool	[Keel]

▼M4

Koagulatsiooninääre	Kops	Süljenääre	Hingetoru
Käärsool	Lümfisõlmed (nii pealispinnalt kui ka sügavalt)	Seemnepõiekesed	Kusepõis
Kaksteistsõrmiksool	Piimanäärmed (kohustuslikud emaste puhul ja kui need on nähtavalt lõigatavad, siis ka isaste puhul)	Skeletilihas	Emakas (sh emakakael)
Munandimanus	[Ülemised hingamisteed, sh nina, ninakarbikud ja ninakõrvalkoopad]	Nahk	[Kusejuha]
Silm (sh võrkkest)	Söögitoru	Seljaaju (kolmel tasandil: kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)	[Kusiti]
[Reieluu koos liigesega]	[Haistmissibul]	Põrn	Tupp
Sapipõis (muud liigid kui rott)	Munasarjad	[Rinnak]	Luuüdi lõige ja/või värske luuüdi aspiraat
Harderi nääre			

Paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks säilitada mõlemad organid. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid. Nahakaudse manustamise uuringute puhul tuleks säilitada need organid, mis on ette nähtud suukaudse manustamise puhul, ja üliioluline on manustamiskohast nahaproovide võtmine ja säilitamine. Inhalatsiooniuuringute korral tuleks hingamisteedest säilitatavate ja uuritavate kudede puhul järgida käesoleva lisa peatükkide B.8 (8) ja B.29 (9) soovitusi. Muude organite/kudede puhul (ja lisaks hingamisteedest pärit konkreetselt säilitatavatele kudedele) tuleks järgida suukaudse manustamise puhul esitatud organite nimekirja.

Histopatoloogia

48. On avaldatud juhendid toksikoloogilise patoloogia uuringute tegemise parimate tavade kohta (32). Tuleb teha vähemalt järgmised histopatoloogilised uuringud:

— suure annuse ja kontrollrühmade loomade kõik koed;

— uuringu vältel surnud või surmatud loomade kõik koed;

— kõik koed, milles täheldatakse makroskoopilisi anomaaliaid;

— sihtkoed või koed, mille puhul suure annuse rühmas on näha kokkupuutest tingitud muutusi, kõikidelt suure annuse rühmade loomadelt;

— paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks uurida mõlemat organit.

▼M4

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

49. Kõigi hinnatavate parameetrite kohta tuleks esitada iga looma andmed. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arv, mürgistusnähtudega loomade arv, täheldatud mürgistusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise toime ilmnemine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta nende loomade protsent, kellel seda esines. Kokkuvõtlikes tabelites tuleks esitada (pidevalt mõõdetud katseandmete puhul) nende loomade keskmised ja standardhälbed, kellel täheldati mürgisuse mõju või kahjustusi, lisaks kahjustuse raskusastme määramisele.

50. Varasemad kontrolli andmed võivad aidata uuringu tulemusi tõlgendada, näiteks kui samaaegse kontrolli andmed erinevad oluliselt sama katsekorralduse juures kontrollrühma loomadelt saadud hiljutistest andmetest. Hindamiseks võetud varasemad kontrolli andmed peaksid pärinema samast laborist, olema saadud sama vanuserühma ja sama liini loomadega ning olema kogutud kõnealusele uuringule eelneva viie aasta jooksul.

51. Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistilised meetodid ja analüüsitavad andmed tuleks valida uuringu kavandamise etapis (punkt 8). Sellisel valimisel tuleks vajaduse korral ette näha, et tulemusi tuleb kohandada ellujäämise määra arvestamiseks.

Katseprotokoll

52. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline olemus, puhtus ja füüsikalis-keemilised omadused;

— tunnusandmed;

— kemikaali päritolu;

— partii number;

— keemilise analüüsi sertifikaat.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;

— loomade arv, vanus ja sugu katse alguses;

▼M4

— päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

— iga looma kehamass katse alguses.

Katsetingimused:

— manustamistee ja doosi valiku põhjendus;

— kui see on kohaldatav, siis andmete analüüsimiseks valitud statistilised meetodid;

— andmed uuritava kemikaali preparaadi/sööda valmistamise kohta;

— analüüsiandmed preparaadis saavutatud kontsentratsiooni, preparaadi stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

— manustamistee ja uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— inhalatsiooniuuringute puhul: kas manustamine toimub ainult nina või kogu keha kaudu;

— tegelik doos (mg kehamassi kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur söödas või joogivees oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (mg/kg või ppm) ja tegeliku doosi vahel;

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Tulemused (tuleks esitada kokkuvõtlikud tabelandmed ja andmed eraldi iga looma kohta):

— ellujäämuse andmed;

— kehamass / kehamassi muutused;

— sööda tarbimine, söödakasutuse tõhususe arvutused (kui need tehti) ja vee tarbimine (kui on kohaldatav);

— toksilise mõju andmed vastavalt looma soole ja doositasemele, sealhulgas mürgistusnähud;

— kliiniliste ilmingute laad, esinemissagedus (ja kui määrati, siis raskusaste) ning kestus (sõltuvalt sellest, kas nähud on mööduvad või püsivad);

— oftalmoloogiline läbivaatus;

— hematoloogilised analüüsid;

— kliinilise biokeemia analüüsid;

— uriinianalüüsid;

— neurotoksilisuse või immunotoksilisuse uuringute tulemused;

— kehamass surmamisel;

— organite mass (ja kui võimalik, siis organi massi / kehamassi suhe);

— lahkamise leiud;

— kõigi kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— võimaluse korral andmed imendumise kohta.

▼M4

Vajaduse korral tulemuste statistiline töötlus.

Tulemuste arutelu:

— mõju sõltuvus doosist;

— võimalikku toimeviisi käsitleva teabe analüüsimine;

— võimaliku modelleerimislähenemisviisi arutelu;

— võrdlusdoosi (BMD), täheldatava kahjuliku toimeta doosi (NOAEL) või vähima täheldatava kahjuliku toimega doosi (LOAEL) kindlaksmääramine;

— varasemad kontrolli andmed;

— asjakohasus inimeste puhul.

Järeldused

KIRJANDUS

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145–191.

4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

5) Käesoleva lisa peatükk B.27 „Subkroonilise suukaudse toksilisuse katse – suukaudse kordusdoosi toksilisuse 90-päevane uuring mittenärilistel".

6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

8) Käesoleva lisa peatükk B.8 „Subakuutne mürgisus sissehingamisel: 28-päevane uuring".

9) Käesoleva lisa peatükk B.29 „Subkrooniline mürgisus sissehingamisel: 90-päevane uuring".

10) Käesoleva lisa peatükk B.9 „Kordusdoosi mürgisus (28 päeva, nahakaudne)".

11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

▼M4

14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

▼**M4**

30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

31) EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al*. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼B

B.31. SÜNNIEELSE ARENGU MÜRGISUSE UURIMUS

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 414 (2001).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev arenguaegse mürgisuse uurimise meetod on välja töötatud selleks, et pakkuda üldist teavet sünnieelse kokkupuute mõjude kohta tiinetel katseloomadel ja emakas areneval organismil; see võib hõlmata nii emalt pärinevat mõjude kui ka surma, strukturaalsete kõrvalekallete või loote muundunud arengu hindamist. Funktsionaalsed puudujäägid, mis on arengu tähtis osa, ei ole käesoleva testi lahutamatu osa. Neid võib uurida eraldi uurimuses või käesoleva uurimuse täiendusena, kasutades neurotoksilisuse uuringutele suunatud katsemeetodit. Funktsionaalsete puudujääkide ja muude sünnijärgsete mõjude uurimist käsitleva teabe puhul tuleks vajadusel pidada nõu kahe põlvkonna reproduktiivse mürgisuse uuringut ja arengulise neurotoksilisuse uuringut käsitleva katsemeetodi üle.

Käesolev katsemeetod võib eeldada konkreetset kohandamist üksikjuhtudel spetsiaalsete, nt katseaine füüsikalis-keemilisi või toksikoloogilisi omadusi puudutavate teadmiste põhjal. Selline kohandamine on aktsepteeritav, kui on olemas veenvad teaduslikud tõendid, et kohandamise tõttu on katse informatiivsem. Sellisel juhul tuleks hoolikalt dokumenteerida uurimisprotokollis nimetatud teaduslikud tõendid.

1.2. MÕISTED

Arengutoksikoloogia – selliste areneva organismi kahjulike mõjude uuring, mis võivad tuleneda kokkupuutest enne viljastumist, sünnieelse arengu ajal või sünnijärgselt kuni seksuaalse küpsuse eani. Arengutoksikoloogia peamised ilmingud on järgmised: 1) organismi surm, 2) strukturaalsed kõrvalekalded, 3) muundunud kasv ja 4) funktsionaalsed puudujäägid. Arengutoksikoloogiale viidati varem sageli kui teratoloogiale.

Kahjulik mõju – selline töötlemisega seotud muutus algtasemest, mis vähendab organismi võimet ellu jääda, sigida või kohaneda keskkonnaga. Võttes arvesse arengutoksikoloogiat, oma kõige laiemas tähenduses sisaldab see mis tahes mõju, mis segab viljastamise tulemuse normaalset arengut nii enne kui ka pärast sündi.

Muundunud areng – järglase organi või keha kaalu või suuruse muutumine.

Muundumised (anomaaliad) – strukturaalsed muundumised, mis hõlmavad nii väärarenguid kui ka muutusi (28).

Väärareng/suur kõrvalekalle – strukturaalne muutus, mida peetakse loomale kahjulikuks (võib olla samuti surmav) ja mida juhtub tavaliselt harva.

▼B

Muutus/väike kõrvalekalle – strukturaalne muutus, millel on vähe või ei ole üldse kahjulikku mõju loomadele; võib olla ajutine ja võib esineda suhteliselt sagedasti kontrollpopulatsioonis.

Viljastumise tulemus (*conceptus*) – viljastunud munaraku derivaatide summa arengu igal etapil viljastumisest kuni sünnini, kaasa arvatud lootevälised kestad ning embrüo või loode.

Implantatsioon (nidatsioon) – lootepõiekese kinnitumine emaka epiteelkoele, kaasa arvatud selle tungimine läbi emakaepiteeli, ning selle kinnitumine emakalimaskestale.

Embrüo – organismi varane või arengustaadium, eelkõige munaraku viljastumise tulemus pärast pikitelje ilmumist ja seni, kuni kõik suuremad struktuurid on olemas.

Embrüotoksilisus – embrüo tavalist struktuuri, arengut, kasvu ja/või elujõulisust kahjustav.

Loode – sündimata järglane embrüojärgsel perioodil.

Lootetoksilisus – loote tavalist struktuuri, arengut, kasvu ja/või elujõulisust kahjustav.

Abort – viljastumise tulemuse (embrüo või mitteelujõulise loote) enneaegne väljumine emakast.

Resorptsioon – viljastumise tulemus *(conceptus),* kes pärast emakasse istutamist sureb või resorbeerub või on resorbeerunud.

Varajane resorptsioon – tõendid implantatsiooni kohta ilma äratuntava embrüo/looteta.

Hiline resorptsioon – surnud embrüo või väliste degeneratiivsete muutustega loode.

NOAEL – lühend sõnadest „no observed adverse effect” – täheldamata kahjuliku mõju tase. See on kõrgeim annus- või kokkupuutetase, kus ei ole täheldatud kahjulikke, töötlemisega seotud leide.

1.3. VÕRDLUSAINE

Puudub.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Tavaliselt manustatakse katseainet tiinetele loomadele vähemalt alates implantatsioonist kuni ühe päevani enne ettemääratud tapmist, mis peaks olema niipalju kui võimalik tavalise sünnitustähtaja lähedal, et ei läheks andmed kaduma varase sünnituse tõttu. Katsemeetod ei ole mõeldud ainult uurima organogeneesi perioodi (nt närilistel 5.–15. päev ja küülikutel 6.–18. päev), vaid samuti kogu tiinusperioodi aegseid mõjusid alates enne implantatsiooni ja lõppedes päev enne keisrilõiget. Natuke enne keisrilõiget emasloomad tapetakse, emakasisu uuritakse ning loodetele antakse hinnang väliselt nähtavate anomaaliate kohta ning pehme koe ja skeletimuutuste kohta.

▼B

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. **Loomaliikide valik**

On soovitav, et katse tehtaks kõige sobivamate liikidega ja et kasutataks laboriliike ja -liine, mida tavaliselt kasutatakse sünnieelse arengutoksilisuse uurimiseks. Eelistatud näriliste liik on rott ja eelistatud muude kui näriliste liik on küülik. Tuleks põhjendada seda, kui kasutatakse muid liike.

1.5.2. **Loomade pidamise ja toitmise tingimused**

Loomade katseruumi temperatuur peaks närilistel olema 22 °C (± 3°) ja küülikutel 18 °C (± 3°). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal, siis eesmärk on hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatu hulga joogiveega.

Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud puurides. Kuna paaritunud loomade puhul eelistatakse eraldi hoidmist, on samuti lubatud väikesearvulistes rühmades hoidmine.

1.5.3. **Loomade ettevalmistamine**

Tuleks kasutada terveid loomi, kes on harjutatud laboritingimustega vähemalt viis päeva ja keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomade liik, liin, päritolu, sugu, kaal ja/või vanus on äratuntavad. Kõikide katserühmade loomad peaksid niipalju kui võimalik olema ühesuguse kaalu ja vanusega. Noori täiskasvanud ja sünnitamata emasloomi tuleks kasutada iga annusmäära juures. Emasloomad tuleks paaritada sama liigi ja liini isasloomadega ning õdedevendade paaritamist tuleks vältida. Näriliste puhul on tiinuse 0-päevaks päev, mil tupekorki ja/või spermat jälgiti; küülikute puhul on 0-päev tavaliselt suguühte või kunstliku viljastamise päev, kui kasutatakse sellist tehnikat. Paaritunud loomad määratakse erapooletult kontroll- või töödeldavatesse rühmadesse. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Igale loomale tuleks anda ainulaadne tunnusnumber. Paaritunud emasloomad tuleks erapooletult jagada kontroll- või töödeldavatesse rühmadesse ning kui emasloomi paaritatakse partiides, tuleks iga partii loomad jaotada ühtlaselt rühmade vahel. Samamoodi tuleks sama isaslooma poolt viljastatud emasloomad jagada ühtlaselt rühmadesse.

1.6. KATSE KÄIK

1.6.1. **Loomade arv ja sugu**

Igas katse- ja kontrollrühmas peaks olema piisaval hulgal emasloomi, et lahanguks saadakse ligikaudu 20 emaslooma, kellel täheldatakse implantatsiooni. Rühmad, kus on alla 16 sellise looma, ei ole sobivad. Emade suremus ei pruugi tunnistada kehtetuks uurimist, tingimusel et see ei ületa 10 %.

▼B

1.6.2. **Annuste valmistamine**

Kui kandeainet või lisandit kasutatakse manustamise lihtsustamiseks, arvesse tuleks võtta järgmisi omadusi: katseaine absorbtsiooni, jaotamist, metabolismi ja peetumist või eritumist käsitlevad mõjud; katseaine keemilisi omadusi käsitlevad mõjud, mis võivad muuta toksilisi omadusi; ning toidu- või veetarbimist või toitumust käsitlevad mõjud. Kandeaine ei tohiks olla arengust lähtuvalt mürgine ega mõjutada reproduktsiooni.

1.6.3. **Annustamine**

Tavaliselt katseainet manustatakse iga päev alates implantatsioonist (nt 5. päev pärast paaritumist) kuni päevani enne kavandatud keisrilõiget. Kui esialgsed uurimused vajaduse korral ei viita preimplanatatsiooni kaotuse kõrgele riskile, võib ravi pikendada kuni kogu tiinusperioodini paaritumiste ja ettekavandatud tapmiseni. On hästi teada, et ebasobiv käsitlemine või tiinusaegne stress võivad viia loote kaotuseni. Et vältida lootekaotust muude kui katsega seotud tegurite poolt, tiinete loomade tarbetu käsitamine ning stress välistest teguritest, nagu näiteks müra, tuleks vältida.

Tuleks kasutada vähemalt kolme annusmäära ja teha samaaegselt kontrolli. Paaritunud loomad jagatakse erapooletult kontroll- või töödeldavatesse rühmadesse. Annusmäärade vahemikud määratakse nii, et saaks hinnata toksilisi mõjusid. Kui katseaine füüsikaliskeemiline laad või bioloogilised omadused ei sea piiranguid, valitakse kõrgeim annus eesmärgiga põhjustada mõningat arenguja/või emale suunatud mürgisust (kliinilised nähud või kehakaalu vähenemine), kuid mitte surma või tõsiseid kannatusi. Vähemalt üks vahepealne annusmäär tekitab minimaalseid täheldatavaid toksilisi mõjusid. Väikseima annusmäära puhul ei tohiks emale suunatud või arengutoksilisust ilmneda. Tuleks valida annusmäärade alanev järjestus, et näidata annusega seotud reaktsiooni ja mittetäheldatud kahjuliku mõju taset (NOAEL). Kahe- või neljakordsed vahemikud on sageli optimaalsed alanevate annusmäärade kehtestamisel ja sageli on eelistatav neljanda katserühma lisamine väga suurte vahemike (nt üle kümnekordne tegur) annuste vahel. Kuigi eesmärgiks on määrata ema täheldamata kahjulikud mõjud, kiideti samuti heaks uuringud, kus sellist vahemikku ei kasuta (1).

Annusmäärad tuleks valida, võttes arvesse olemasolevaid andmeid mürgisuse kohta ning ka lisateavet katseaine või samalaadse aine metabolismi ja toksikokineetika kohta. Käesolev teave aitab samuti viidata sellele, et annustamisrežiim on adekvaatne.

Tuleks kasutada samaaegset kontrollrühma. Nimetatud rühmaks on võltskontrollrühm (platseebot saav kontrollrühm) või kandeainet saav kontrollrühm, kui kandeainet kasutatakse katseaine manustamisel. Kõikidele rühmadele tuleks manustada sama kogus kas katseainet või kandeainet. Kontrollrühma(de) loomi tuleks kohelda nii nagu katserühma loomi. Kandeainet saavatele kontrollrühmadele tuleks anda suurim kogus kasutatud kandeaineid (madalaim katserühm):

▼B

1.6.4. **Piirsisalduskatse**

Kui suukaudne annusmäär on vähemalt 1 000 mg kg kehakaalu kohta päevas, kasutades käesolevas uurimuses kirjeldatud menetlusi, täheldatavat mürgisust põhjustamata, kas tiinetel loomadel ja/või nende järglastel ning kui mõju eeldatavasti ei põhine olemasolevatel andmetel (nt struktuuriliselt ja/või metaboolselt samalaadsed ühendid), siis ei peeta vajalikuks kolme annusmäära kasutavat täielikku uurimust. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutavatest annustest suuremate suukaudsete annuste kasutamise vajadusele. Muude manustamisviiside puhul, nagu näiteks sissehingamine või nahakaudne kasutamine, võivad katseaine füüsikalis-keemilised omadused tihti viidata ja piirata suurimat saavutatava kokkupuutumise ulatusega (nt nahakaudne kasutamine ei põhjusta rasket paikset mürgisust).

1.6.5. **Annuste manustamine**

Katseainet või kandeained manustatakse tavaliselt suu kaudu intubeerimise teel. Kui kasutatakse muud manustamisviisi, peaks katse tegija põhjendama selle valikut ja asjakohased muutused võivad olla vajalikud (2, 3, 4). Katseainet tuleks manustada ligikaudu samal ajal iga päev.

Üksikute loomade annus peab tavaliselt põhinema kõige viimasel ühe looma kehakaalu kindlaksmääramisel. Annuse määramisel tuleks siiski olla ettevaatlik tiinuse viimasel trimestril. Varasemaid andmeid tuleks kasutada annuse valimisel, et vältida liigset emale suunatud mürgisust. Kui liigset mürgisust on täheldatud käsitletud emasloomadel, tuleks need loomad humaanselt tappa. Kui mitmetel tiinetel loomadel on liigse mürgisuse nähud, tuleks kaaluda nimetatud annusrühma lõpetamist. Kui aineid manustatakse sundsöötmise teel, peaks see olema eelistatult ühekordne annus loomadele söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil. Vedeliku suurim kogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Maht ei tohiks ületada 1 ml 100 g kehakaalu kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kui võib kasutada mahtu 2 ml 100 g kehakaalu kohta. Kui kandeainena kasutatakse maisiõli, ei tohiks selle maht ületada 0,4 ml 100 g kehakaalu kohta. Katsekoguse muutlikkust tuleks vähendada, kohandades kontsentratsioone konstantse koguse tagamiseks kõikidel annusmääradel.

1.6.6. **Emasloomade jälgimine**

Kliinilised vaatlused tuleks teha ja registreerida vähemalt üks kord päevas, soovitavalt sama ajal iga päev, võttes arvesse pärast annustamist oodatavate mõjude kõrgperioodi. Loomade seisund tuleks registreerida, kaasa arvatud suremus, haigestumus, asjassepuutuvad käitumismuutused ning kõik selge mürgisuse nähud.

1.6.7. **Kehakaal ja toidu tarbimine**

Loomi tuleks kaaluda tiinuse 0-päeval ja mitte hiljem kui tiinuse 3. päeval, kui kasutatakse välise aretaja tarnitud aegpaaritunud loomi, annustamise esimesel päeval, vähemalt iga kolme päeva tagant annustamisperioodil ja ettemääratud tapmise päeval.

▼B

Toidu tarbimist tuleks registreerida kolmepäevaste ajavahemike tagant ja see peaks kokku langema kehakaalu kindlaksmääramisega.

1.6.8. **Tapajärgne uurimine**

Emasloomad tuleks tappa päev enne oodatavat sünnitustähtpäeva. Emasloomad, kellel ilmnevad abordi või enneaegse sünnituse nähud enne ettemääratud tapmiskuupäeva, tuleks tappa ja neile tehakse põhjalik makroskoopiline uuring.

Lõpetamise ajal või uurimuse käigus aset leidnud surma korral tuleks uurida emaslooma makroskoopiliselt igasuguste strukturaalsete kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste osas. Emasloomade hindamine keisrilõike ajal ja sellele järgnevad looteanalüüsid tuleks teha soovitavalt teadmata, millisesse rühma emasloom kuulub, et vähendada süstemaatilist viga.

1.6.9. **Emakasisu uurimine**

Vahetult pärast lõpetamist või nii kiiresti kui võimalik pärast surma tuleks emakas eemaldada ja kinnitada loomade tiinust. Emakat, mis ei ole tiine, tuleks edasi uurida (nt näriliste puhul ammooniumsulfiidiga värvimisega ja Salewski värvimisega või muu sobiva meetodiga küülikute puhul), et kinnitada tiinuse puudumist (5).

Tiine emakas, kaasa arvatud emakakael, tuleks ära kaaluda. Tiine emaka kaalu ei tohiks saada loomadelt, kes surid katse käigus.

Kollakehade arv tuleks kindlaks määrata tiinete loomade puhul.

Emakasisu tuleks uurida mitmete embrüo- või lootesurmade suhtes ja elujõuliste loodete suhtes. Resorptsiooni ulatust tuleks kirjeldada, et hinnata *conceptus*'e surma suhtelist aega (vt punkti 1.2).

1.6.10. **Loodete uurimine**

Iga loote sugu ja kehakaal tuleks kindlaks määrata.

Iga loodet uuritakse väliste muundumiste suhtes (6).

Looteid uuritakse skeleti- ja pehmekoe muundamiste osas (nt muutused ja väärarengud või anomaaliad) (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). Loote muunduste liigitamine on soovitav, kuid mitte nõutav. Kui liigitamine on tehtud, tuleks selgesti sõnastada iga kategooria kindlaks määramise kriteeriumid. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivorganile, mida tuleks uurida muundunud arengu tunnuste suhtes.

Närilistel ligikaudu pool pesakonnast valmistataks ette skeletimuundumiste uurimiseks. Ülejäänud pesakond valmistatakse ette pehmekoe muundumiste uurimiseks, kasutades heakskiidetud või sobivat mikrotoommenetlust või hoolsat dissekteerimistehnikat.

▼B

Muude kui näriliste puhul, nt küülikud, tuleks uurida kõiki looteid nii pehmekoe- kui ka skeletimuutuste suhtes. Nende loodete kehasid hinnatakse hoolsa dissekteerimise abil pehmekoemuutuste osas, mis võivad hõlmata jätkumenetlusi südame sisestruktuuri (25) hindamiseks. Pooltel, selliselt uuritud loodetel eemaldatakse pead, mille pehmekoemuutusi (sh silmad, aju, ninaõõned ja keel) uuritakse tavalise mikrotoommenetluse abil (26) või võrdselt tundliku meetodi abil. Nende loodete kehad ja ülejäänud looted, keda ei ole uuritud, prepareeritakse skeletimuutuste uurimise tarbeks, kasutades samu meetodeid nagu näriliste puhul.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Andmed edastatakse iga emaslooma ja nende järglase kohta tabeli kujul, näidates iga katserühma ja põlvkonna kohta loomade arvu katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel tapetud loomade arvu, surma ja humaanse tapmise ajad, tiinete emasloomade arvu, mürgisuse nähtudega loomade aru, mürgisuse nähtude kirjelduse, sh toksiliste mõjude algusaja, kestuse ja raskuse, embrüot/loodet käsitlevate vaatluste liigid ja kogu asjaomane teave pesakonna kohta.

Numbrilisi tulemusi hinnatakse asjaomase statistilise meetodi abil, kasutades andmeanalüüsi üksusena pesakonda. Kasutatakse üldiselt heakskiidetud statistilist meetodit; statistilised meetodid tuleks valida uurimuse kavandamisel ja neid tuleks põhjendada. Andmed loomadest, kes ei ela ettemääratud tapmiseni, tuleks samuti edastada. Nimetatud andmed võivad sisalduda rühmakeskmiste hulgas vajaduse korral. Sellistelt loomadelt saadud andmete olulisus ja seetõttu nende sisaldumist rühmakeskmis(t)e hulgas või sealt väljajätmist tuleks põhjendada ja hinnata ükshaaval.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE

Sünnieelse arengutoksilisust käsitleva uurimuse avastusi hinnatakse vaadeldud mõjude tähenduses. Hindamine peab hõlmama järgmist teavet:

— ema ja embrüot/loodet uuriva katse tulemused, sh loomade katseainega kokkupuute ning kõikide avastuste esinemise ja raskuse vahelise seose või selle puudumise hindamine;

— loote väliste muutuste, pehmekoe- ja skeletimuutuste liigitamisel kasutatavad kriteeriumid, kui liigitamist on kasutatud;

▼B

— vajaduse korral ajaloolised kontrollandmed katsetulemuste tõlgendamise tõhustamiseks;

— kõikide protsendimäärade või indeksite arvutamisel kasutatud arvud;

— vajaduse korral katseavastuste piisav statistiline analüüs, mis peaks sisaldama piisavalt teavet analüüsimeetodi kohta, nii et sõltumatu arvustaja/statistik saaks uuesti hinnata ja rekonstrueerida analüüsi.

Igas katses, mis tõendab toksiliste mõjude puudumist, tuleks kaaluda jätkuuurimisi katseaine absorbtsiooni ja biosaadavuse kindlaksmääramiseks.

2.3. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Sünnieelset arengutoksilisust käsitlev katse annab teavet emasloomade korduva ainega kokkupuute kohta tiinuse ajal ja nende järglase üsasisese arengu kohta. Katse tulemusi tõlgendatakse koostoimes subkroonilisel, reproduktsiooni, toksikokineetilisel ja muudel katsetel saadud avastustega. Kuna rõhutatakse nii üldist mürgisust emale mõjuva mürgisuse tähenduses kui ka arengutoksilisuse lõpppunkte, võimaldavad katsetulemused mingis teatud ulatuses vahetegemist üldise toksilisuse puudumisel asetleidvate arengumõjude ja nende arengumõjude vahel, mis on tekkinud tasemetel, mis on samuti emasloomale (27) mürgised.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

— füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— tunnusandmed, kaasa arvatud CASi number, kui see on teada/kasutusel;

— puhtus.

Kandeaine (vajadusel):

— kandeaine valiku põhjendus, kui see on muu kui vesi. Katseloomad:

kasutatud liigid ja liinid;

— loomade arv ja vanus;

— päritolu, elamistingimused, toitumine jne;

— iga looma kaal katse alguses.

— Katsetingimused:

annuste valiku põhjendus;

— katseaine valmistamise/toiduvalmistise üksikandmed, saavutatud kontsentratsioon, valmistise stabiilsus ja homogeensus;

— katseaine manustamise üksikasjad;

▼B

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kg kehakaalu kohta päevas) vajaduse korral;

— keskkonnatingimused;

— üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta.

— Tulemused

Andmed emaslooma mürgisele annusele reageerimise kohta,

sealhulgas:

— loomade arv katse alguses, ellujäänud loomade arv, tiinete loomade arv ja katkenud tiinusega loomade arv, enneaegselt sünnitanud loomade arv;

— surmapäev katse ajal või andmed loomade ellujäämise kohta kuni lõpetamiseni;

— andmed loomade kohta, kes ei elanud kuni ettemääratud tapmiseni, edastatakse, kuid ei sisaldu rühmadevahelistes statistilistes võrdlustes;

— iga ebatavalise kliinilise tunnuse jälgimise päev ja selle edasiarenemine;

— kehakaal, kehakaalu muutus ja tiine emaka kaal, sh valikuliselt kehakaalu muutus, mida on korrigeeritud tiine emaka kaalu võrra;

— toidu tarbimine ja, kui seda on mõõdetud, vee tarbimine;

— lahangu leiud, sh emaka kaal;

— edastatakse NOAEL-väärtused ema ja areneva loote kohta.

Arenguga seotud lõpp-punktid annuse järgi pesakonna kohta, kellel on implantaadid, kaasa arvatud:

— kollakehade arv;

— implantatsioonide arv, elus ja surnud loodete ning resorptsioonide arv ja protsent;

— implantatasioonieelsete või -järgsete tiinuste katkemise arv ja protsent.

Arenguga seotud lõpp-punktid annuse järgi pesakonna kohta, kus on elus looted, kaasa arvatud:

— elus järglaste arv ja protsent;

— sooline jagunemine;

— loote kehakaal, soovitavalt soo järgi ja kombineeritud mõlema sooga;

— väliste, pehmekoe- ja skeletivääräarengud ning muud asjaomased muutused;

— liigitamise kriteeriumid vajaduse korral;

▼B

— loodete ja selliste pesakondade koguarv ja protsent, kellel on välised, pehmekoe- või skeletimuutused. ning individuaalsete anomaaliate ja muude asjaomaste muutuste liigid ja esinemine.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. Risk Analysis 16; 399-410.

2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. Fundamental and Applied Toxicology 14; 386-398.

3) Wong, B.A., et al. (19 9 7) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. CUT Activities 17; 1-8.

4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologic 247:367.

6) Edwards, J.A. (19 6 8) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In Advances in Teratology. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. Congenital Anomalies 16; 171-173.

8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. Congenital Anomalies 32;:381-391.

9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. Teratology 47:229-242.

10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. Teratology 37; 476.

11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. Journal of Morphology 127:291-306.

12) Fritz, H. (19 74) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. Teratology 11; 313-320.

13) Gibson, J.P. et al. (19 6 6) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. Toxicology and Applied Pharmacology 9; :398-408.

14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? Teratology 8; 309-316.

15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. Teratology 46; 169-181.

▼B

16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to Teratology Workshop Manual, pp. 163-173.

17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. American Journal of Anatomy 41; 411-445.

18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. Stain Technology 39; 61-63.

19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. American Journal of Anatomy 36; 313-355.

20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 4; 181-188.

21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) The Genesis of the Rat Skeleton. Thomas, Springfield, IL.

22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In Teratology: Principles and Techniques, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) Handbook of Teratology, Vol. 4. Plenum, NY.

24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 28; 233-239.

25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. Teratology 9; 37-38.

26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: Methods in Prenatal Toxicology Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. Federal Register 56; 63798-63826.

28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mamma ls (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

B.32. **KANTSEROGEENSUSE UURINGUD**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 451 (2009). Esialgne kantserogeensuse uuringuid käsitlev katsejuhend TG 451 võeti vastu 1981. aastal. Käesoleva läbivaadatud katsemeetodi B.32 koostamist peeti vajalikuks, et võtta arvesse hiljutist arengut loomade heaolu ja regulatiivsete nõuete valdkonnas (2, 3, 4, 5, 6). Käesolevat katsemeetodit B.32 on ajakohastatud paralleelselt käesoleva lisa peatüki B.30 („Kroonilise mürgisuse uuringud") ja peatüki B.33 („Kombineeritud kroonilise mürgisuse/kantserogeensuse uuringud") läbivaatamisega selleks, et saada uuringus kasutatavate loomade abil lisateavet ning esitada täpsemaid andmeid dooside valiku kohta. Käesolev katsemeetod B.32 on koostatud selleks, et kasutada seda mitmesuguste kemikaalide, sh pestitsiidide ja tööstuslike kemikaalide katsetamiseks. Siiski tuleks märkida, et mõned üksikasjad ja nõuded võivad ravimite puhul olla erinevad (vt rahvusvahelise ühtlustamiskonverentsi suunis S1B, mis käsitleb ravimite kantserogeensuse katsetamist).

2. Enamik kantserogeensuse uuringuid tehakse näriliseliikidega ja käesolev katsemeetod on seega kavandatud peamiselt kasutamiseks nende liikidega tehtavate uuringute puhul. Kui kõnealuseid uuringuid on vaja teha muu loomaliigi kui närilistega, tuleks käesoleva katsemeetodi põhimõtteid ja toimimiskäiku kasutada koos nendega, mis on esitatud käesoleva lisa peatükis B.27 „Subkroonilise suukaudse toksilisuse katse – suukaudse kordusdoosi toksilisuse 90-päevane uuring mittenärilistel" (6) ja teha asjakohased muudatused. Täiendavad suunised on esitatud OECD juhenddokumendis nr 116, mis käsitleb kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute kavandamist ja tegemist (7).

3. Kantserogeensuse uuringutes kasutatavad kolm peamist manustamisteed on suukaudne, nahakaudne ja sissehingamise teel manustamine. Manustamisviisi valik sõltub uuritava kemikaali füüsikalistest ja keemilistest omadustest ning inimeste peamisest võimalikust kokkupuuteviisist ainega. Lisateave kokkupuutetee valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

4. Käesolevas katsemeetodis on keskendutud suukaudsele manustamisele, mis on kantserogeensuse uuringutes enim kasutatav manustamistee. Kuigi inimeste tervist ohustavate riskide hindamiseks võivad vajalikud olla ka kantserogeensuse uuringud, mis hõlmavad nahakaudset või sissehingamise teel toimuvat kokkupuudet, ja/või neid võidakse nõuda teatavate eeskirjadega, on mõlema nimetatud kokkupuutetee puhul katsete korraldamine tehniliselt keeruline. Kõnealused uuringud tuleb kavandada juhtumipõhiselt, kuigi siin suukaudse manustamise kantserogeensuse hindamiseks kirjeldatud katsemeetodi võib võtta aluseks sissehingamise teel ja/või nahakaudse manustamise uuringu katse-eeskirja koostamisel, arvestades soovitusi manustamise ajavahemike, kliiniliste parameetrite ja patoloogianäitajate jne kohta. Uuritavate kemikaalide nahakaudse (7) ja sissehingamise teel (7, 8) manustamise kohta on avaldatud OECD juhenddokumendid. Kui kavandatakse sissehingamise kaudu toimuvat kokkupuudet hõlmavaid pikaajalisi uuringuid, tuleks eelkõige vaadata käesoleva lisa peatükke B.8 (9) ja B.29 (10) koos sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse uurimist käsitleva OECD juhenddokumendiga (8). Nahakaudse manustamise katsete tegemise kohta tuleks vaadata käesoleva lisa peatükki B.9 (11).

▼M4

5. Kantserogeensuse uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral kasutatava liigi kogu eluea jooksul. Uuringuga saadakse teavet uuritava kemikaali mürgiste mõjude, sealhulgas võimaliku kantserogeensuse kohta, võidakse teha kindlaks sihtorganid ja kemikaali akumulatsiooni võimalikkus. Sellega võidakse hinnata täheldatava kahjuliku toimeta doosi taset toksilise mõju puhul ning mittegenotoksiliste kantserogeenide puhul kasvajate teket; saadud andmeid saab kasutada inimeste kokkupuute jaoks ohutuskriteeriumide kehtestamiseks. Samuti rõhutatakse vajadust teha loomade hoolikas kliiniline läbivaatus, et hankida võimalikult palju teavet.

6. Käesoleva katsemeetodi kohaste kantserogeensuse uuringute eesmärgid on järgmised:

— uuritava kemikaali selliste kantserogeensete omaduste kindlakstegemine, mis põhjustavad uudismoodustiste arvu suurenemist, pahaloomuliste uudismoodustiste osakaalu suurenemist või uudismoodustiste tekkeni kuluva aja lühenemist, võrreldes samaaegsete kontrollrühmadega;

— kantserogeense toime sihtorgani(te) tuvastamine;

— uudismoodustiste tekkimiseni kuluva aja kindlakstegemine;

— kasvajaid tekitava mõju doosist sõltuvuse kirjeldamine;

— täheldatava kahjuliku toimeta doositaseme (*no-observed-adverse-effect level*, NOAEL) või võrdlusdoosi (*Benchmark Dose*, BMD) kindlakstegemiseks lähtepunkti määramine;

— kantserogeense toime ekstrapoleerimine inimeste madala doositasemega kokkupuutele;

— andmete saamine toimeviisi käsitlevate hüpoteeside kontrollimiseks (2, 7, 12, 13, 14, 15).

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Uuritava kemikaali võimalike kantserogeensete omaduste hindamisel peaks uurimislabor enne uuringu tegemist võtma arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et uuringu kavandamisel keskenduda kantserogeense toime võimaluse kõige tõhusamale katsetamisele ja minimeerida loomade kasutamine. Teave eeldatava kantserogeeni toimeviisi kohta ja selle arvessevõtmine (2, 7, 12, 13, 14, 15) on eriti tähtis, kuna katse optimaalseks kavandamiseks võib olla vaja teada, kas uuritav kemikaal on teadaolev või eeldatav genotoksiline kantserogeen. Täpsemad juhendid toimeviisi arvestamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

8. Uuringu kavandamist hõlbustav teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalis-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse, sealhulgas genotoksilisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed, mutageensus/genotoksilisus, kantserogeensus ja muud toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta; olemasolevad toksiko-kineetilised andmed (võimaluse korral ühekordse doosi ja korduvdoosi kineetika) ning muud korduva kokkupuute uuringutega saadud andmed.

▼M4

Kantserogeensust tuleks uurida alles pärast esialgse mürgisust käsitleva teabe saamist korduvdoosi 28-päevasest ja/või 90-päevasest mürgisuse katsest. Kasulikku teavet võivad anda ka lühiajalised vähi tekke ja arenemise katsed. Konkreetse uuritava kemikaali võimalike kahjulike tervisemõjude üldhindamisel tuleks kaaluda kantserogeensuse järkjärgulise uurimise lähenemisviisi (16, 17, 18, 19).

9. Enne uuringu alustamist tuleks uuringu kava ja eesmärkide alusel kindlaks määrata kõige sobivamad tulemuste analüüsi statistilised meetodid. Kaaluda tuleb seda, kas statistika peaks hõlmama ellujäämuse arvessevõtmist, katses ellujäämise kestusega seotud kasvajatekke kumulatiivse riski analüüsi, kasvaja tekkimiseni kuluva aja analüüsi ning analüüsi tegemist ühe või mitme rühma kavandatust varasema surmamise korral. Suunised asjakohaste statistiliste analüüside tegemiseks ja peamised viited rahvusvaheliselt tunnustatud statistilistele meetoditele on esitatud juhenddokumentides nr 116 (7) ning nr 35, milles käsitletakse kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute analüüsi ja hindamist (20).

10. Kantserogeensuse uuringu tegemisel tuleks alati järgida suunispõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 19 kliiniliste nähtude tuvastamise, hindamise ja kasutamise kohta ohutuse hindamisel kasutatavate katseloomade humaansete lõpetamiskriteeriumidena (21) ja eelkõige selle punktis 62. Kõnealuses punktis on sätestatud, et „[k]ui uuringutes, milles kasutatakse korduvat annustamist, tekivad loomal kliinilised progresseeruvad nähud, mis põhjustavad tema seisundi halvenemise, tuleb teha andmetel põhinev otsus, kas loom tuleks humaansel viisil surmata. Otsuse tegemisel tuleks kaaluda kõnealuse uuringus osaleva looma jätkuvast elushoidmisest saadava teabe väärtust võrreldes looma üldise seisundiga. Kui tehakse otsus kõnealune loom katsesse jätta, tuleks vajaduse korral suurendada vaatluste sagedust. Ilma katse eesmärki kahjulikult mõjutamata võib samuti olla võimalik annustamise ajutine peatamine, kui see vähendab looma valu või kannatusi, või katsedoosi vähendamine.”

11. Üksikasjalikke suuniseid ja arutelu kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute doosi valimise põhimõtete kohta on võimalik leida juhenddokumendist nr 116 (7) ning samuti kahest rahvusvahelise bioteaduste instituudi väljaandest (22, 23). Doosi valimise strateegia sõltub põhiliselt uuringu peamisest eesmärgist või peamistest eesmärkidest (punkt 6). Sobivate doositasemete valimisel tuleks saavutada tasakaal ühelt poolt ohu sõeluuringute ja teiselt poolt väikese doosi mõju iseloomustamise ning doosi ja mõju vahelise seose kindlakstegemise vahel. See on eriti oluline juhul, kui tehakse kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuring (käesoleva lisa peatükk B.33; punkt 12).

12. Tuleks kaaluda eraldi kroonilise mürgisuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.30) ja kantserogeensuse uuringu (käesolev katsemeetod B.32) tegemise asemel kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.33) tegemist. Kombineeritud katse võimaldab kokku hoida aega ja kulusid, võrreldes kahe eraldi uuringu tegemisega, kuid annab samasuguse kvaliteediga andmed nii kroonilise mürgisuse kui ka kantserogeensuse kohta. Kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.33) tegemisel tuleks siiski hoolikalt kaaluda doosi valimise põhimõtteid (punktid 11 ja 22–25) ning tuleb ka tunnistada, et mõnikord nõutakse eraldi uuringute tegemist eeskirjadega.

▼M4

13. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 116 (7).

KATSE PÕHIMÕTE

14. Uuritavat kemikaali manustatakse iga päev astmeliselt suurenevate doosidena mitmele katseloomade rühmale enamiku nende eluea kestel, tavaliselt suukaudselt. Sissehingamise teel või nahakaudne manustamine võib samuti olla sobiv. Katseloomi vaadeldakse hoolikalt mürgistusnähtude ja uudismoodustistest põhjustatud kahjustuste arengu jälgimiseks. Katse ajal surnud või tapetud loomad lahatakse ning katse lõpus tapetakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

15. Käesoleva katsemeetodiga hinnatakse peamiselt kantserogeensust näriliste jaoks (punkt 2). Muu loomaliigi kui näriliste kasutamist võib kaaluda siis, kui olemasolevad andmed osutavad, et selline liik sobib paremini inimesele avalduva tervisemõju prognoosimiseks. Liigi valikut tuleks põhjendada. Närilistest eelistatakse rotte, kuigi kasutada võib ka teisi närilisi, nt hiiri. Kuigi hiire kasutamine kantserogeensuse katsetel võib anda piiratud väärtusega tulemusi (24, 25, 26), nõutakse mõne praegu kehtiva regulatiivse kava alusel kantserogeensuse katsetamist hiirtel, kui ei ole kindlaks tehtud, et kõnealune uuring ei ole teaduslikult vajalik. Rotid ja hiired on olnud eelistatud katsemudelid tänu nende suhteliselt lühikesele elueale, laialdasele kasutamisele farmakoloogia- ja toksikoloogiauuringutes, võimalusele kutsuda neil kergesti esile kasvajaid ja tänu piisavalt iseloomustatud liinide kättesaadavusele. Nende omaduste tulemusena on olemas palju teavet nende füsioloogia ja patoloogia kohta. Lisateave liigi ja aretusliini valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

16. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Kantserogeensuse uuring tuleks eelistatavalt teha samast liinist ja sama päritoluga loomadega, keda kasutati lühema kestusega mürgisuse eeluuringu(te)s. Kui kõnealusest liinist ja kõnealuse päritoluga loomad võivad teadaolevalt põhjustada probleeme pikaajaliste uuringute üldtunnustatud ellujäämiskriteeriumide (vt juhenddokument nr 116 (7)) saavutamisel, tuleks kaaluda sellise loomaliini kasutamist, kelle ellujäämise määr on pikaajalise uuringu jaoks vastuvõetav. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined.

Pidamis- ja söötmistingimused

17. Loomi võib hoida eraldi või väikestes samast soost loomade rühmades; eraldi pidamist tuleks kaaluda ainult juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud (27, 28, 29). Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (±3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Sööt peaks vastama kõigile uuritava liigi toitumisvajadustele ja sööda saasteainesisaldus, sh pestitsiidijäägid, püsivad orgaanilised saasteained, fütoöstrogeenid, raskmetallid ja mükotoksiinid,

▼M4

mis võivad mõjutada katse tulemusi, peaks olema võimalikult väike. Regulaarselt tuleks analüüsida sööda toitainete ja saasteainete sisaldust; vähemalt tuleks seda teha uuringu alguses ja siis, kui hakatakse kasutama uut söödapartiid, ning analüüside tulemused tuleks esitada lõpparuandes. Samuti tuleks esitada uuringus kasutatud joogivee analüüsi andmed. Sööda valikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali jaoks sobiv segu ja rahuldada loomade toitumisvajadused, kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga.

Loomade ettevalmistamine

18. Kasutada tuleks terveid loomi, kes on labororitingimustega vähemalt seitsme päeva jooksul kohanenud ning keda ei ole varem uuringutes kasutatud. Näriliste korral tuleks loomadele uuritava kemikaali annustamist alustada võimalikult varakult pärast võõrutamist ja kohanemist ning eelistatavalt enne, kui loomad on kaheksa nädala vanused. Katseloomi tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Uuringu alguses peaks kummagi soo loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ja kõrvalekalle ei tohiks ületada 20 % uuringus kasutatavate loomade keskmisest kehamassist, mis leitakse eraldi kummagi soo loomade jaoks. Loomad tuleks kontroll- ja katserühmadesse jaotada juhuslikkuse alusel. Pärast juhuslikkuse alusel jaotamist ei tohiks rühmades kummagi soo keskmised kehamassid oluliselt erineda. Kui erinevused on statistiliselt olulised, tuleks juhuslikkuse alusel jaotamise etappi võimaluse korral korrata. Igale loomale tuleks määrata ainuline tunnusnumber ja loom tuleks kõnealuse numbriga püsivalt märgistada tätoveerimise, mikrokiibi paigaldamise või muu sobiva meetodi abil.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

19. Tuleks kasutada mõlemat sugu. Tuleks kasutada piisavat arvu loomi, et oleks võimalik põhjalik bioloogiline ja statistiline hindamine. Iga doosirühm ja samaaegne kontrollrühm peaks seega koosnema vähemalt 50 loomast kummagi soo kohta. Olenevalt uuringu eesmärgist võib suurendada peamiste näitajate statistilist tähtsust, kui jaotada loomad doosirühmadesse diferentseeritult (mitte võrdselt), nii et väikese doosi rühmades on rohkem kui 50 looma, näiteks väikeste dooside võimaliku kantserogeense mõju prognoosimiseks. Siiski tuleb tunnistada, et rühma mõningane suurendamine lisab uuringule suhteliselt vähe statistilist kaalu. Lisateave uuringu statistilise kavandamise ja doositasemete valiku kohta statistilise olulisuse maksimeerimiseks on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

Loomade vahepealne surmamine ja satelliitrühmad (kontrollrühmad)

20. Kui see on teaduslikult põhjendatud, võib uuringus ette näha vahepealsed surmamised, näiteks 12 kuu möödumisel, et saada teavet uudismoodustiste arengu ja toimemehhanismi kohta. Kui selline teave on uuritava kemikaaliga tehtud varasematest korduvdoosi mürgisuse uuringutest juba olemas, ei pruugi vahepealsed surmamised olla teaduslikult põhjendatud. Kui uuringu kavas on vahepealseid surmamisi, on igas vahepealseks surmamiseks ette nähtud doosirühmas tavaliselt kümme looma kummagi soo kohta, ja uuringus kasutatavate loomade koguarvu tuleks suurendada nende loomade arvu võrra, keda on kavas surmata enne uuringu lõppu. Vajaduse korral võib uuringu vältel lisada haigusseisundi seireks täiendava kontroll-loomade rühma (tavaliselt viis looma kummastki soost) (30). Täpsemad juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

▼M4

Doosirühmad ja doseerimine

21. Juhendid kõigi doosi valiku ja doositaseme intervallidega seotud asjaolude kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Tuleks kasutada vähemalt kolme doosimäära ja samaaegset kontrollrühma. Doositasemed põhinevad üldjuhul lühema ajavahemiku korduvdoosi või doosipiirkonna määramise katse tulemustel ja nende puhul tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali või samalaadsete kemikaalide kohta olemasolevat toksikoloogia- ja toksikokineetikaalast teavet.

22. Kui uuritava kemikaali füüsikalis-keemilised omadused või bioloogiline mõju seda ei piira, peaks kõrgeim doositase olema valitud nii, et saaks määrata kindlaks peamised sihtorganid ja toksilise toime, põhjustamata siiski kannatusi, ägedat mürgisust, haigestumist või surma. Punktis 23 allpool loetletud asjaolusid arvesse võttes tuleks tavaliselt valida kõrgeim doositase, et saada tõendusmaterjali mürgisuse kohta, näiteks kehakaalu tõusu vähenemise kaudu (ligikaudu 10 %). Sellest hoolimata võidakse uuringu eesmärkidest olenevalt (vt punkt 6) valida suurim doos, mis jääb allapoole mürgisust tõendavat doosi, näiteks kui doos avaldab teatavat kahjulikku mõju, kuid siiski ei mõjuta eluiga ega kehakaalu.

23. Doositaseme ja doositasemete intervalli võib valida nii, et määrata kindlaks mõju sõltuvus doosist, ning, olenevalt uuritava kemikaali toimeviisist, täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) või muu soovitud uuringutulemus, näiteks võrdlusdoos (BMD) (vt punkt 25) madalaimal doositasemel. Asjaolud, mida tuleks väiksemate dooside valimisel arvesse võtta, on toime doosist sõltuvuse eeldatav tõus, doosid, mis võivad põhjustada olulisi metaboliseerimise muutusi või toksilisuse toimemehhanismi muutumist, kui eeldatakse läviväärtuse olemasolu, või mille puhul eeldatakse väikeste dooside ekstrapoleerimise lähtepunkti olemasolu.

24. Doositasemete vahemik sõltub uuritava kemikaali omadustest ja seda ei saa käesoleva katsemeetodiga ette kirjutada, aga kahe- kuni neljakordne vahemik alanevate doositasemete määramisel annab sageli häid katsetulemusi ning dooside vahel väga suure (näiteks rohkem kui kuue- kuni kümnekordse) vahemiku kasutamise asemel on sageli parem lisada neljas katserühm. Üldiselt tuleks vältida kümnest suurema kordaja kasutamist ja kui seda tehakse, tuleks seda põhjendada.

25. Nagu juhenddokumendis nr 116 (7) on selgitatud, tuleb doosi valimisel arvesse võtta järgmist:

— doosi-toime sõltuvuse teadaolev või oletatav mittelineaarsus või murdepunkt;

— toksikokineetika ja doosipiirkonnad, mille puhul esineb metaboolne induktsioon, küllastumine või väliste ja sisemiste dooside vaheline mittelineaarsus või seda ei esine;

— esmaskahjustused, toimemarkerid või märgid sellest, et tuleb arvesse võtta peamiste bioloogiliste alusprotsesside toimumist;

— peamised (või oletatavad) toimeviisi asjaolud, näiteks annused, mille juures hakkab suurenema tsütotoksilisus, mõjutatakse hormoonitasemeid, homeostaasi säilitamise mehhanismid saavad üle koormatud jne;

▼M4

— mõju doosist sõltuvuse kõvera piirkonnad, kus on vaja eriti usaldusväärset hinnangut, näiteks eeldatava võrdlusdoosi (BMD) vahemikus või oletatava läviväärtuse juures;

— inimeste kokkupuute eeldatava tasemega seotud kaalutlused.

26. Kontrollrühm on rühm, kellega katseid ei tehta, või kandeaine kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet kõige suuremas koguses, mida kasutatakse doosirühmades. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga ja katseloomad söövad seda sööda halvema maitse tõttu oluliselt vähem, võib asjakohasema kontrollrühma tagamiseks olla sobiv täiendav kontrollrühm, kes saab samapalju sööta, kui doosirühmas ära süüakse.

Dooside ettevalmistamine ja uuritava kemikaali manustamine

27. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu koos sööda või joogiveega või sundsöötmisega. Lisateave manustamisteede ja -meetodite kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Manustamistee ja -meetod sõltub uuringu eesmärgist, uuritava kemikaali füüsikalistest/keemilistest omadustest, biosaadavusest ning inimese uuritava kemikaaliga kokkupuutumise peamisest teest ja viisist. Manustamistee ja -meetodi valikut tuleks põhjendada. Loomade heaolu arvestades tuleks suukaudne manustamine sundsöötmisega üldiselt valida ainult selliste ainetega, mille puhul kui see manustamistee ja -meetod on põhjendatult sarnane inimese võimaliku kokkupuutega kemikaaliga (näiteks ravimid). Toidu- või keskkonnakemikaalide puhul, sh pestitsiidide puhul toimub manustamine tavaliselt sööda või joogivee kaudu. Mõne stsenaariumi puhul, näiteks kokkupuude töökohal, võib olla asjakohasem manustada kemikaali muul viisil.

28. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmisi kandeaine ja muude lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotumisele, metaboliseerimisele või retentsioonile; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi, ning mõjud sööda või vee tarbimisele või loomade toitumusele. On soovitatav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ja siis võimalikku lahust muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul tuleks teada kandeaine mürgiseid omadusi. Tuleks teada uuritava kemikaali stabiilsust ning doseerimislahuste või sööda (nagu on asjakohane) homogeensust manustamise tingimustes (näiteks söödaga).

29. Nende kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Pikas mürgisuse uuringus, kus kemikaali manustatakse sööda kaudu, ei tohiks uuritava kemikaali kontsentratsioon söödas üldiselt olla suurem kui 5 % sööda üldkogusest, et vältida tasakaalustamata toitumist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (mg sööda kg kohta või ppm) või püsivat doositaset looma kehamassi alusel (mg kehakaalu kg kohta), mis arvutatakse iga nädal. Tuleks täpsustada, millist võimalust kasutatakse.

▼M4

30. Suukaudse manustamise korral manustatakse loomadele uuritavat kemikaali iga päev (seitse päeva nädalas), näriliste puhul üldjuhul 24 kuu vältel (vt ka punkt 32). Iga muu doseerimismeetodi (nt viis päeva nädalas) kasutamist tuleb põhjendada. Nahakaudse manustamise puhul töödeldakse loomi üldjuhul uuritava kemikaaliga 24 kuu vältel vähemalt kuus tundi päevas seitse päeva nädalas, nagu on sätestatud käesoleva lisa peatükis B.9 (11). Sissehingamise teel toimuv kokkupuude toimub kuus tundi päevas ja seitse päeva nädalas; võib kasutada ka kokkupuudet viiel päeval nädalas, kui see on põhjendatud. Kokkupuuteperiood on tavaliselt 24 kuud. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseliigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Kui päevas kasutatakse alla kuuetunnist kokkupuute kestust, tuleks seda põhjendada. Vt ka käesoleva lisa peatükk B.8 (9).

31. Kui loomadele manustatakse uuritavat kemikaali sundsöötmisega, tuleks seda teha iga päev umbes samal kellaajal maosondi või sobiva intubatsioonikanüüli abil. Tavaliselt manustatakse üks annus üks kord päevas, kui aga kemikaal on näiteks lokaalne ärritaja, võib igapäevase doosimäära säilitada, manustades jaotatud annust (kaks korda päevas). Suurim vedelikukogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus peaks olema nii väike kui praktiliselt võimalik ega tohiks üldjuhul näriliste puhul ületada 1 ml kehakaalu 100 g kohta (31). Katses kasutatava mahu erinevusi tuleks vähendada miinimumini; püsiva mahu tagamiseks tuleks kõikidel doositasemetel kasutada erinevaid kontsentratsioone. Erandiks on võimaliku söövitava või ärritava mõjuga kemikaalid, mida tuleb tugeva paikse mõju vältimiseks lahjendada. Tuleks vältida katseid kontsentratsioonidel, mis tõenäoliselt võivad seedetrakti söövitada või ärritada.

Uuringu kestus

32. Uuringu kestus on näriliste puhul tavaliselt 24 kuud, mis moodustab suurema osa kasutatavate loomade tavalisest elueast. Võib kasutada lühemat või pikemat uuringu kestust, olenevalt uuringus kasutatava loomaliigi liini elueast, aga seda tuleks põhjendada. Konkreetsete hiireliinide puhul, näiteks liin AKR/J, C3H/J või C57BL/6J, võib asjakohasem olla 18kuuline kestus. Allpool on esitatud suunised uuringu kestuse ja lõpetamise ning ellujäämuse kohta; täpsemad suunised, sh uuringus ellujäämusega võrreldes negatiivse kantserogeensuse lubatavuse kaalumine, on esitatud OECD juhenddokumendis nr 116, mis käsitleb kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute koostamist ja elluviimist (7).

— Kui väiksema doosi rühmade või kontrollrühma ellujäänute arv langeb alla 25 %, tuleks kaaluda uuringu lõpetamist.

— Kui mürgistuse tõttu sureb enneaegselt ainult suure doosi rühm, ei tohiks selle pärast uuringut lõpetada.

— Kummagi soo ellujäämust tuleks arvesse võtta eraldi.

— Uuringut ei tohiks pikendada selle ajavahemikuni, kus uuringust saadavad andmed ei ole enam piisavad statistiliselt kehtivate hinnangute andmiseks.

▼**M4**

VAATLUSED

33. Kõiki loomi tuleks haigestumise või suremise suhtes kontrollida, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, sh nädalavahetustel ja pühadel. Loomi tuleks täiendavalt kontrollida kord päevas konkreetsete mürgistusnähtude suhtes, võttes sundsöötmisega manustamise puhul arvesse eeldatava mõju kõrgperioodi pärast doseerimist. Erilist tähelepanu tuleks pöörata kasvajate tekkimisele; iga nähtava või palpeeritava tuumori kohta tuleb märkida ilmumise aeg, paiknemine, mõõtmed, välimus ja areng.

Kehamass, sööda ja vee tarbimine ning söödakasutuse tõhusus

34. Kõiki loomi tuleks kaaluda kemikaali manustamise alguses, vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Sööda tarbimist ja söödakasutuse tõhusust tuleks mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ning seejärel vähemalt kord kuus. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, siis tuleks vee tarbimist mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Joogivee tarbimise mõõtmisi tuleks kaaluda ka uuringute puhul, milles muutub loomade joomiskäitumine.

Hematoloogilised, kliinilise biokeemia ja muud mõõtmised

35. Uuringust saadava teabe, eelkõige toimeviisiga seotud teabe maksimeerimiseks tuleks uuringu juhi äranägemise järgi võtta hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia analüüside jaoks vereproove. Samuti võib olla asjakohane uriinianalüüsi tegemine. Täpsemad juhendid kantserogeensuse uuringu raames kõnealuste proovide võtmise väärtuse kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Kui peetakse vajalikuks, võib hematoloogiliste ja kliinilise keemia näitajate kindlaksmääramiseks võtta vereproovid ja teha uriinianalüüs vahepealse surmamise osana (punkt 20) ning uuringu lõpus vähemalt kümne loomaga kummagi soo ja iga rühma kohta. Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast, näiteks otse südamest või retroorbitaalsest siinusest, kasutades tuimestust, ning kui proov on võetud, tuleks seda hoida vajalikes tingimustes. Uurimiseks võib samuti valmistada vere äigepreparaadid, eelkõige juhul, kui luuüdi näib olevat sihtorgan, kuigi kõnealuse uuringu väärtus kantserogeense/onkogeense mõju hindamiseks on küsitav (32).

PATOLOOGIA

Täielik lahkamine

36. Kõik uuringus kasutatud loomad, v.a kontroll-loomad (vt punkt 20) ja muud satelliitrühma loomad, läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Kontroll-loomade ja muude satelliitrühma loomade puhul võib uuringu juht konkreetsel juhul otsustada, kas lahkamine on vajalik. Organite massi kantserogeensuse uuringutes tavaliselt ei määrata, kuna geriaatrilised muutused ja hilisematel etappidel kasvajate areng piirab organite massi andmete kasulikkust. Kõnealused andmed võivad siiski olla üliolulised tõendusmaterjali kaalukuse hindamisel ja eelkõige toimeviisi hindamisel. Kui satelliituuringus seda määratakse, tuleks kõnealused andmed koguda hiljemalt aasta möödumisel uuringu algusest.

▼**M4**

37. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 33) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskkonnas (kandilistes sulgudes esitatud organite uuring ei ole kohustuslik):

Kõik silmaga nähtavad kahjustused	Süda	Kõhunääre	Magu (eesmagu, mao näärmeline osa)
Neerupealis	Niudesool	Kõrvalkilpnääre	[Hambad]
Aort	Tühisool	Perifeerne närv	Munandid
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/sild)	Neerud	Ajuripats	Harknääre
Umbsool	Pisaranääre (eksorbitaalne)	Eesnääre	Kilpnääre
Emakakael	Maks	Pärasool	[Keel]
Koagulatsiooninääre	Kops	Süljenääre	Hingetoru
Käärsool	Lümfisõlmed (nii pealispinnalt kui ka sügavalt)	Seemnepõiekesed	Kusepõis
Kaksteistsõrmiksool	Piimanääre (kohustuslik emaste puhul ja kui see on nähtavalt lõigatav, siis isaste puhul)	Skeletilihas	Emakas (sh emakakael)
Munandimanus	[Ülemised hingamisteed, sh nina, ninakarbikud ja nina kõrvalkoopad]	Nahk	[Kusejuha]
Silm (sh võrkkest)	Söögitoru	Seljaaju (kolmel tasandil: kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)	[Kusiti]
[Reieluu koos liigesega]	[Haistmissibul]	Põrn	Tupp
Sapipõis (muud liigid kui rott)	Munasarjad	[Rinnak]	Luuüdi lõige ja/või värske luuüdi aspiraat
Harderi nääre			

Paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks säilitada mõlemad organid. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid. Nahakaudse manustamise uuringute puhul tuleks säilitada need organid, mis on ette nähtud suukaudse manustamise puhul, ning ülioluline on manustamiskohast nahaproovide võtmine ja säilitamine. Inhalatsiooniuuringute korral tuleks hingamisteedest säilitatavate ja uuritavate kudede puhul järgida käesoleva lisa peatükkide B.8 ja B.29 soovitusi. Muude organite/kudede puhul (ja lisaks hingamisteedest pärit konkreetselt säilitatavatele kudedele) tuleks järgida suukaudse manustamise puhul esitatud organite nimekirja.

▼M4

Histopatoloogia

38. On avaldatud juhendid toksikoloogilise patoloogia uuringute tegemise parimate tavade kohta (33). Tuleb teha vähemalt järgmised histopatoloogilised uuringud:

— suure annuse ja kontrollrühma loomade kõik koed;

— uuringu vältel surnud või surmatud loomade kõik koed;

— kõik koed, milles täheldatakse makroskoopilisi anomaaliaid, kaasa arvatud kasvajad;

— kui suure doosi rühmas täheldatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogilisi muutusi, kontrollitakse kõikide muude doosirühmade loomadel samu kudesid;

— paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks uurida mõlemat organit.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

39. Kõigi hinnatavate parameetrite kohta tuleks esitada iga looma andmed. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arv, mürgistusnähtudega loomade arv, täheldatud mürgistusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise toime ilmnemine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta nende loomade protsent, kellel seda esines. Kokkuvõtlikes tabelites tuleks esitada (pidevalt mõõdetud katseandmete puhul) nende loomade keskmised ja standardhälbed, kellel täheldati mürgisuse mõju või kahjustusi, lisaks kahjustuse raskusastme määramisele.

40. Varasemad kontrolli andmed võivad aidata uuringu tulemusi tõlgendada, näiteks kui samaaegse kontrolli andmed erinevad oluliselt sama katsekorralduse juures kontrollrühma loomadelt saadud hiljutistest andmetest. Hindamiseks võetud varasemad kontrolli andmed peaksid pärinema samast laborist, olema saadud sama vanuserühma ja sama liini loomadega ning olema kogutud kõnealusele uuringule eelneva viie aasta jooksul.

41. Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistilised meetodid ja analüüsitavad andmed tuleks valida uuringu kavandamise etapis (punkt 9). Sellisel valimisel tuleks vajaduse korral ette näha, et tulemusi tuleb kohandada ellujäämise määra arvestamiseks.

Katseprotokoll

42. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline olemus, puhtus ja füüsikalis-keemilised omadused;

— tunnusandmed;

▼**M4**

— kemikaali päritolu;

— partii number;

— keemilise analüüsi sertifikaat.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;

— loomade arv, vanus ja sugu katse alguses;

— päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

— iga looma kehamass katse alguses.

Katsetingimused:

— manustamistee ja annuse valiku põhjendus;

— kui see on kohaldatav, siis andmete analüüsimiseks valitud statistilised meetodid;

— andmed uuritava kemikaali preparaadi/sööda valmistamise kohta;

— analüüsiandmed preparaadis saavutatud kontsentratsiooni, preparaadi stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

— manustamistee ja uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— inhalatsiooniuuringute puhul: kas manustamine toimub ainult nina või kogu keha kaudu;

— tegelik doos (mg kehakaalu kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur söödas või joogivees oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (mg/kg või ppm) ja tegeliku doosi vahel;

— toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Tulemused (tuleks esitada kokkuvõtlikud tabelandmed ja andmed eraldi iga looma kohta)

Üldosa:

— ellujäämuse andmed;

— kehamass / kehamassi muutused;

— sööda tarbimine, söödakasutuse tõhususe arvutused (kui need tehti) ja vee tarbimine, kui see on kohaldatav;

— võimaluse korral toksiko-kineetilised andmed;

— oftalmoskoopia võimaluse korral;

— hematoloogia andmed võimaluse korral;

— kliinilise keemia andmed võimaluse korral.

▼M4

Kliinilised leiud:

— toksilisuse tunnused;

— iga anomaalia esinemissagedus (ja kui määrati, siis raskusaste);

— kliiniliste ilmingute laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas ilmingud on ajutised või püsivad).

Lahkamise andmed:

— kehamass surmamisel;

— organite mass (ja kui võimalik, siis organi massi / kehamassi suhe);

— lahkamise leiud; anomaaliate esinemissagedus ja raskusaste.

Histopatoloogia:

— uudismoodustistega mitteseotud histopatoloogilised leiud;

— uudismoodustistega seotud histopatoloogilised leiud;

— korrelatsioon makroskoopiliste ja mikroskoopiliste tulemuste vahel;

— kõigi kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus koos raskusastme hindamisega;

— aruanne mikroskoobipreparaatide võimalike vastastikuste hindamiste kohta.

Vajaduse korral tulemuste statistiline töötlus.

Tulemuste arutelu:

— võimalike modelleerimispõhiste lähenemisviiside arutelu;

— toime sõltuvus doosist;

— varasemad kontrolli andmed;

— võimalikku toimeviisi käsitleva teabe analüüsimine;

— võrdlusdoosi (BMD), täheldatava kahjuliku toimeta doosi (NOAEL) või vähima täheldatava kahjuliku toimega doosi (LOAEL) kindlaksmääramine;

— asjakohasus inimeste puhul.

Järeldused

KIRJANDUS

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

▼M4

6) Käesoleva lisa peatükk B.27 „Subkroonilise suukaudse toksilisuse katse – suukaudse kordusdoosi toksilisuse 90-päevane uuring mittenärilistel”.

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Käesoleva lisa peatükk B.8 „Subakuutne mürgisus sissehingamisel: 28-päevane uuring”.

10) Käesoleva lisa peatükk B.29 „Subkrooniline mürgisus sissehingamisel: 90-päevane uuring”.

11) Käesoleva lisa peatükk B.9 „Kordusdoosi mürgisus (28 päeva, nahakaudne)”.

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) 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.

▼**M4**

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279–284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196–1203.

27) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198–201.

33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4

B.33. **KOMBINEERITUD KROONILISE TOKSILISUSE – KANTSEROGEENSUSE UURING**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 453 (2009). Esialgne katsejuhend TG 453 võeti vastu 1981. aastal. Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi B.33 koostamist peeti vajalikuks, et võtta arvesse hiljutist arengut loomade heaolu ja regulatiivsete nõuete valdkonnas (1, 2, 3, 4, 5). Käesolevat katsemeetodit B.33 on ajakohastatud paralleelselt käesoleva lisa peatüki B.32 („Kantserogeensuse uuringud") ja peatüki B.30 („Kroonilise mürgisuse uuringud") läbivaatamisega selleks, et saada uuringus kasutatavate loomade abil lisateavet ning esitada täpsemaid andmeid dooside valiku kohta. Käesolev katsemeetod on koostatud selleks, et kasutada seda mitmesuguste kemikaalide, sh pestitsiidide ja tööstuslike kemikaalide katsetamiseks. Siiski tuleks märkida, et mõned üksikasjad ja nõuded võivad ravimite puhul olla erinevad (vt rahvusvahelise ühtlustamiskonverentsi suunis S1B, mis käsitleb ravimite kantserogeensuse katsetamist).

2. Enamik kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringuid tehakse näriliseliikidega ja käesolev katsemeetod on seega kavandatud peamiselt kasutamiseks nende liikidega tehtavate uuringute puhul. Kui selliseid uuringuid on vaja teha mittenärilistega, võib samuti rakendada käesolevas katsemeetodis kirjeldatud põhimõtteid ja toimimiskäiku koos põhimõtete ja toimimiskäiguga, mida on kirjeldatud käesoleva lisa peatükis B.27 („Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenäriliste puhul") (6) koos asjakohaste muudatustega, nagu on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 116, mis käsitleb kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute kavandamist ja tegemist (7).

3. Kroonilise mürgisuse – kantserogeensuse uuringutes kasutatavad kolm peamist manustamisteed on suukaudne, nahakaudne ja sissehingamise teel manustamine. Manustamisviisi valik sõltub uuritava kemikaali füüsikalistest ja keemilistest omadustest ning inimeste peamisest võimalikust ainega kokkupuutumise viisist. Lisateave kokkupuutetee valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

4. Käesolevas katsemeetodis on keskendutud suukaudsele manustamisele, mis on kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringutes enim kasutatav manustamistee. Kuigi inimeste tervist ohustavate riskide hindamiseks võivad vajalikud olla ka pikaajalised uuringud, mis hõlmavad nahakaudset või sissehingamise teel toimuvat kokkupuudet, ja/või neid võidakse nõuda teatavate eeskirjadega, on mõlema nimetatud kokkupuutetee puhul katsete korraldamine tehniliselt keeruline. Kõnealused uuringud tuleb kavandada juhtumipõhiselt, kuigi siin suukaudse manustamise kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse hindamiseks kirjeldatud katsemeetodi võib võtta aluseks sissehingamise teel ja/või nahakaudse manustamise uuringu katse-eeskirja koostamisel ja arvestades manustamise ajavahemikke, kliinilisi ja patoloogilisi parameetreid jne käsitlevaid soovitusi. On olemas OECD juhenddokumendid uuritava kemikaali sissehingamise teel (7, 8) ja nahakaudselt (7) manustamise kohta. Kui kavandatakse sissehingamise kaudu toimuvat kokkupuudet hõlmavaid pikaajalisi uuringuid, tuleks eelkõige vaadata käesoleva lisa peatükke B.8 (9) ja B.29 (10) koos sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse uurimist käsitleva OECD juhenddokumendiga (8). Nahakaudse manustamise katsete tegemisel tuleks vaadata käesoleva lisa peatükki B.9 (11).

▼**M4**

5. Kombineeritud kroonilisuse mürgisuse – kantserogeensuse uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral kasutatava liigi kogu eluea jooksul. Uuringuga saadakse teavet uuritava kemikaali mürgiste mõjude, sealhulgas võimaliku kantserogeensuse kohta, võidakse teha kindlaks sihtorganid ja kemikaali akumulatsiooni võimalikkus. Sellega võidakse hinnata täheldatava kahjuliku toimeta doosi taset toksilise mõju puhul ning mittegenotoksiliste kantserogeenide puhul kasvajate teket; saadud andmeid saab kasutada inimeste kokkupuute jaoks ohutuskriteeriumide kehtestamiseks. Samuti rõhutatakse vajadust teha loomade hoolikas kliiniline läbivaatus, et hankida võimalikult palju teavet.

6. Käesoleva katsemeetodi kohaste kroonilise mürgisuse – kantserogeensuse uuringute eesmärgid on järgmised:

— uuritava kemikaali selliste kantserogeensete omaduste kindlakstegemine, mis põhjustavad uudismoodustiste arvu suurenemist, pahaloomuliste uudismoodustiste osakaalu suurenemist või uudismoodustiste tekkeni kuluva aja lühenemist, võrreldes samal ajal kasutatavate kontrollrühmadega;

— uudismoodustiste tekkimiseni kuluva aja kindlakstegemine;

— uuritava kemikaali kroonilise mürgisuse kindlaksmääramine;

— kroonilise mürgisuse ja kantserogeense toime sihtorgani(te) tuvastamine;

— mõju doosist sõltuvuse kirjeldamine;

— täheldatava kahjuliku toimeta doositaseme (*no-observed-adverse-effect level*, NOAEL) või võrdlusdoosi (*Benchmark Dose*, BMD) kindlakstegemiseks lähtepunkti määramine;

— kantserogeense toime ekstrapoleerimine inimeste madala doositasemega kokkupuutele;

— kroonilise mürgise mõju prognoosimine inimeste kokkupuutetasemetel;

— andmete saamine toimeviisi käsitlevate hüpoteeside kontrollimiseks (2, 7, 12, 13, 14, 15).

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Uuritava kemikaali võimalike kantserogeensete ja kroonilise mürgisuse omaduste hindamisel peaks uurimislabor enne uuringu tegemist võtma arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et uuringu kavandamisel keskenduda toksikoloogilise toime võimaluse kõige tõhusamale katsetamisele ja minimeerida loomade kasutamine. Teave eeldatava kantserogeeni toimeviisi kohta ja selle arvessevõtmine (2, 7, 12, 13, 14, 15) on eriti tähtis, kuna katse optimaalseks kavandamiseks võib olla vaja teada, kas uuritav kemikaal on teadaolev või eeldatav genotoksiline kantserogeen. Täpsemad juhendid toimeviisi arvestamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

8. Uuringu kavandamist hõlbustav teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalis-keemilised omadused; teave võimaliku toimeviisi kohta; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse, sealhulgas genotoksilisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed, mutageensus/genotoksilisus, kantserogeensus ja muud toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta; olemasolevad toksiko-kineetilised andmed (võimaluse korral ühekordse doosi ja korduvdoosi kineetika) ning muud korduva kokkupuute

▼M4

uuringutega saadud andmed. Kroonilist mürgisust ja kantserogeensust tuleks uurida alles pärast esialgse mürgisust käsitleva teabe saamist korduvdoosi 28-päevasest ja/või 90-päevasest mürgisuse katsest. Kasulikku teavet võivad anda ka lühiajalised vähi tekke ja arenemise katsed. Konkreetse uuritava kemikaali võimalike kahjulike tervisemõjude üldhindamisel tuleks kaaluda kantserogeensuse järkjärgulise uurimise lähenemisviisi (16, 17, 18, 19).

9. Enne uuringu alustamist tuleks uuringu kava ja eesmärkide alusel kindlaks määrata kõige sobivamad tulemuste analüüsi statistilised meetodid. Kaaluda tuleb seda, kas statistika peaks hõlmama ellujäämuse arvessevõtmist, katses ellujäämise kestusega seotud kasvajatekke kumulatiivse riski analüüsi, kasvaja tekkimiseni kuluva aja analüüsi ning analüüsi tegemist ühe või mitme rühma kavandatust varasema surmamise korral. Suunised asjakohaste statistiliste analüüside tegemiseks ja peamised viited rahvusvaheliselt tunnustatud statistilistele meetoditele on esitatud juhenddokumentides nr 116 (7) ning nr 35, milles käsitletakse kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute analüüsi ja hindamist (20).

10. Kantserogeensuse uuringu tegemisel tuleks alati järgida suunispõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 19 kliiniliste nähtude tuvastamise, hindamise ja kasutamise kohta ohutuse hindamisel kasutatavate katseloomade humaansete lõpetamiskriteeriumidena (21) ja eelkõige selle punktis 62. Kõnealuses punktis on sätestatud, et „[k]ui uuringutes, milles kasutatakse korduvat annustamist, tekivad loomal kliinilised progresseeruvad nähud, mis põhjustavad tema seisundi halvenemise, tuleb teha andmetel põhinev otsus, kas loom tuleks humaansel viisil surmata. Otsuse tegemisel tuleks kaaluda kõnealuse uuringus osaleva looma jätkuvast elushoidmisest saadava teabe väärtust võrreldes looma üldise seisundiga. Kui tehakse otsus kõnealune loom katsesse jätta, tuleks vajaduse korral suurendada vaatluste sagedust. Ilma katse eesmärki kahjulikult mõjutamata võib samuti olla võimalik annustamise ajutine peatamine, kui see vähendab looma valu või kannatusi, või katsedoosi vähendamine.”

11. Üksikasjalikke suuniseid ja arutelu kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute doosi valimise põhimõtete kohta on võimalik leida juhenddokumendist nr 116 (7) ning samuti kahest rahvusvahelise bioteaduste instituudi väljaandest (22, 23). Doosi valimise strateegia sõltub põhiliselt uuringu peamisest eesmärgist või peamistest eesmärkidest (punkt 6). Sobivate doositasemete valimisel tuleks saavutada tasakaal ühelt poolt ohu sõeluuringute ja teiselt poolt väikese doosi mõju iseloomustamise ning doosi ja mõju vahelise seose kindlakstegemise vahel. See on eriti asjakohane käesoleva kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu puhul.

12. Tuleks kaaluda eraldi kroonilise mürgisuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.30) ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.32) tegemise asemel käesoleva kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu tegemist. Kombineeritud katse võimaldab kokku hoida aega ja kulusid ning mõnevõrra vähendada ka katseloomade kasutamist, võrreldes kahe eraldi uuringu tegemisega, kuid annab samasuguse kvaliteediga andmed nii kroonilise mürgisuse kui ka kantserogeensuse kohta. Kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu tegemisel tuleks siiski hoolikalt kaaluda doosi valimise põhimõtteid (punktid 11 ja 22–26) ning tuleb ka tunnistada, et mõnikord nõutakse eraldi uuringute tegemist eeskirjadega. Täpsemad juhendid kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu kavandamise kohta, et kasutada võimalikult vähe katseloomi ning teha uuring võimalikult lihtsalt ja tõhusalt, on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

▼M4

13. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 116 (7).

KATSE PÕHIMÕTE

14. Uuringu kava koosneb kahest paralleelsest etapist: kroonilisuse etapp ja kantserogeensuse etapp (kestused on esitatud vastavalt punktides 34 ja 35). Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu, kuigi ka sissehingamise või nahakaudse kokkupuute uurimine võib olla sobiv. Kroonilisuse etapi puhul manustatakse uuritavat kemikaali iga päev astmeliste doosidena mitmele katseloomade rühmale, igale katseloomade rühmale ühel doosiastmel, tavaliselt 12 kuu vältel, kuigi regulatiivsetest nõuetest olenevalt võib katse kestus olla ka pikem või lühem (vt punkt 34). Katse selline kestus tagab, et see on piisavalt pikk kumulatiivse mürgisuse mõjude avaldumiseks, kuid tulemusi ei hakka veel segama geriaatrilised muutused. Uuringu kavaga võib ette näha ühe või mitu vahepealset surmamist, näiteks kolme ja kuue kuu möödudes, ja selle võimaldamiseks võib kasutada täiendavaid loomarühmi (vt punkt 20). Kantserogeensuse etapi puhul manustatakse uuritavat kemikaali iga päev mitmele katseloomade rühmale nende elueast suure osa vältel. Mõlemal etapil vaadeldakse katseloomi hoolikalt mürgistusnähtude ja uudismoodustistest põhjustatud kahjustuste arengu jälgimiseks. Katse ajal surnud või tapetud loomad lahatakse ning katse lõpus tapetakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

15. Käesoleva katsemeetodiga hinnatakse peamiselt kroonilist mürgisust ja kantserogeensust näriliste jaoks (punkt 2). Muu loomaliigi kui näriliste kasutamist võib kaaluda siis, kui olemasolevad andmed osutavad, et selline liik sobib paremini inimesele avalduva tervisemõju prognoosimiseks. Liigi valikut tuleks põhjendada. Närilistest eelistatakse rotte, kuigi kasutada võib ka teisi närilisi, nt hiiri. Kuigi hiire kasutamine kantserogeensuse katsetel võib anda piiratud väärtusega tulemusi (24, 25, 26), nõutakse mõne praegu kehtiva regulatiivse kava alusel kantserogeensuse katsetamist hiirtel, kui ei ole kindlaks tehtud, et kõnealune uuring ei ole teaduslikult vajalik. Rotid ja hiired on olnud eelistatud katsemudelid tänu nende suhteliselt lühikesele elueale, laialdasele kasutamisele farmakoloogia- ja toksikoloogiauuringutes, võimalusele kutsuda neil kergesti esile kasvajaid ja tänu piisavalt iseloomustatud liinide kättesaadavusele. Nende omaduste tulemusena on olemas palju teavet nende füsioloogia ja patoloogia kohta. Kui nõutakse kroonilise mürgisuse – kantserogeensuse uuringut muu liigiga kui närilised, peaks selle kavandamine ja tegemine toetuma põhimõtetele, mis on esitatud käesolevas katsemeetodis ja käesoleva lisa peatükis B.27 („Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenäriliste puhul”) (6). Lisateave liigi ja aretusliini valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

16. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse kombineeritud uuring tuleks eelistatavalt teha samast liinist ja sama päritoluga loomadega, keda kasutati lühema kestusega mürgisuse eeluuringu(te)s. Kui kõnealusest liinist ja kõnealuse päritoluga loomad võivad teadaolevalt põhjustada probleeme pikaajaliste uuringute üldtunnustatud ellujäämiskriteeriumide (vt juhenddokument nr 116 (7)) saavutamisel, tuleks kaaluda sellise loomaliini kasutamist, kelle ellujäämise määr on pikaajalise uuringu jaoks vastuvõetav. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined.

▼M4

Pidamis- ja söötmistingimused

17. Loomi võib hoida eraldi või väikestes samast soost loomade rühmades; eraldi pidamist tuleks kaaluda ainult juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud (27, 28, 29). Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (±3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Sööt peaks vastama kõigile uuritava liigi toitumisvajadustele ja sööda saasteainesisaldus, sh pestitsiidijäägid, püsivad orgaanilised saasteained, fütoöstrogeenid, raskmetallid ja mükotoksiinid, mis võivad mõjutada katse tulemusi, peaks olema võimalikult väike. Regulaarselt tuleks analüüsida sööda toitainete ja saasteainete sisaldust; vähemalt tuleks seda teha uuringu alguses ja siis, kui hakatakse kasutama uut söödapartiid, ning analüüside tulemused tuleks esitada lõpparuandes. Samuti tuleks esitada uuringus kasutatud joogivee analüüsi andmed. Sööda valikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali jaoks sobiv segu ja rahuldada loomade toitumisvajadused, kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga.

Loomade ettevalmistamine

18. Kasutada tuleks terveid loomi, kes on labororitingimustega vähemalt seitsme päeva jooksul kohanenud ning keda ei ole varem uuringutes kasutatud. Näriliste korral tuleks loomadele uuritava kemikaali annustamist alustada võimalikult varakult pärast võõrutamist ja kohanemist ning eelistatavalt enne, kui loomad on kaheksa nädala vanused. Katseloomi tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Uuringu alguses peaks kummagi soo loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ja kõrvalekalle ei tohiks ületada 20 % uuringus kasutatavate loomade keskmisest kehamassist, mis leitakse eraldi kummagi soo loomade jaoks. Loomad tuleks kontroll- ja katserühmadesse jaotada juhuslikkuse alusel. Pärast juhuslikkuse alusel jaotamist ei tohiks rühmades kummagi soo keskmised kehamassid oluliselt erineda. Kui erinevused on statistiliselt olulised, tuleks juhuslikkuse alusel jaotamise etappi võimaluse korral korrata. Igale loomale tuleks määrata ainuline tunnusnumber ja loom tuleks kõnealuse numbriga püsivalt märgistada tätoveerimise, mikrokiibi paigaldamise või muu sobiva meetodi abil.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

19. Tuleks kasutada mõlemat sugu. Tuleks kasutada piisavat arvu loomi, et oleks võimalik põhjalik bioloogiline ja statistiline hindamine. Näriliste puhul peaks kantserogeensuse etapil igas doosirühmas (nagu on näidatud punktis 22) ja samaaegses kontrollrühmas seega olema vähemalt 50 looma kummastki soost. Olenevalt uuringu eesmärgist võib suurendada peamiste näitajate statistilist tähtsust, kui jaotada loomad doosirühmadesse diferentseeritult (mitte võrdselt), nii et väikese doosi rühmades on rohkem kui 50 looma, näiteks väikeste dooside võimaliku kantserogeense mõju prognoosimiseks. Siiski tuleb tunnistada, et rühma mõningane suurendamine lisab uuringule suhteliselt vähe statistilist kaalu. Kroonilise mürgisuse etapil peaks igas doosirühmas (nagu on näidatud punktis 22) ja samaaegses kontrollrühmas seega olema vähemalt kümme looma kummastki soost, kui

▼M4

kasutatakse närilisi. Tuleb märkida, et see arv on väiksem kui kroonilise mürgisuse uuringu puhul (käesoleva lisa peatükk B.30). Väiksema loomade arvuga rühma andmete tõlgendamine kõnealuse kombineeritud uuringu kroonilise mürgisuse etapil toetub aga uuringu kantserogeensuse etapi suurema arvu loomade põhjal saadud andmetele. Hiirtega tehtavates uuringutes võib olla vajalik kasutada kroonilise mürgisuse etapil igas doositaseme rühmas rohkem loomi, et teha kõik nõutavad hematoloogilised analüüsid. Lisateave uuringu statistilise kavandamise ja doositasemete valiku kohta statistilise olulisuse maksimeerimiseks on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

Loomade vahepealne surmamine, satelliitrühm ja kontroll-loomad

20. Kui see on teaduslikult põhjendatud, võib uuringus ette näha vahepealsed surmamised, näiteks kroonilise mürgisuse etapil kuue kuu möödumisel, et saada teavet muude kui uudismoodustistega seotud muutuste arengu ja toimemehhanismi kohta. Kui selline teave on uuritava kemikaaliga tehtud varasematest korduvdoosi mürgisuse uuringutest juba olemas, ei pruugi vahepealsed surmamised olla teaduslikult põhjendatud. Uuringu tavaliselt 12 kuud kestva (punkt 34) kroonilise mürgisuse etapil kasutatavatest loomadest saadakse vahepealse surmamise andmed uuringu kantserogeensuse etapi jaoks, millega vähendatakse kasutatavate loomade üldarvu. Uuringu kroonilise mürgisuse etapil võidakse samuti kasutada satelliitrühmi, et jälgida uuritava kemikaali põhjustatud mis tahes toksikoloogiliste muutuste pöörduvust. Nende puhul võidakse piirduda uuringu suurima doositasemega ja kontrollrühmaga. Vajaduse korral võib uuringu vältel lisada haigusseisundi seireks täiendava kontroll-loomade rühma (tavaliselt viis looma kummastki soost) (30). Täpsemad suunised uuringu kavandamise kohta, et hõlmata vahepealsed surmamised, satelliitrühmade ja kontroll-loomade kasutamine, minimeerides samal ajal kasutatud loomade üldarvu, on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

21. Kui uuringu kavas on satelliitloomi ja/või vahepealseid surmamisi, on igas vahepealseks surmamiseks ette nähtud doosirühmas tavaliselt kümme looma kummagi soo kohta, ja uuringus kasutatavate loomade üldarvu tuleks suurendada nende loomade arvu võrra, keda on kavas surmata enne uuringu lõppu. Vahepeal surmatavate ja satelliitloomade puhul tuleks üldiselt teha samad vaatlused, sh kehamassi ja sööda/vee tarbimise mõõtmised, hematoloogilised ja kliinilise biokeemia mõõtmised ning patoloogiauuringud, kui põhiuuringu kroonilise mürgisuse etapi loomade puhul, kuigi võib ka otsustada, et vahepealse surmamise rühmade puhul piirdutakse konkreetsete peamiste näitajate, näiteks neurotoksilisuse või immunotoksilisuse mõõtmisega.

Doosirühmad ja doseerimine

22. Juhendid kõigi doosi valiku ja doositaseme intervallidega seotud asjaolude kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Tuleks kasutada vähemalt kolme doosimäära ja samaaegset kontrollrühma nii kroonilise mürgisuse kui ka kantserogeensuse etapil. Doositasemed põhinevad üldjuhul lühema ajavahemiku korduvdoosi või doosipiirkonna määramise katse tulemustel ja nende puhul tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali või samalaadsete kemikaalide kohta olemasolevat toksikoloogia- ja toksikokineetikaalast teavet.

▼M4

23. Uuringu kroonilise mürgisuse etapi puhul ei pruugita vajalikuks pidada kolme doositaset hõlmavat täielikku uuringut, kui võib eeldada, et katse tegemine ühel doositasemel, mis on võrdne vähemalt 1 000 mg kehakaalu kg kohta päevas, ei põhjusta tõenäoliselt kahjulikke mõjusid. See peaks põhinema eeluuringutest saadud teabel ja kaalutlusel, et mürgisust samalaadse struktuuriga ainete andmete alusel ei eeldata. Võib kasutada piirdoosi 1 000 mg kehakaalu kg kohta päevas, välja arvatud juhul, kui inimese võimalikku kokkupuudet arvestades on vaja kasutada suuremat doositaset.

24. Kui uuritava kemikaali füüsikalis-keemilised omadused või bioloogiline mõju seda ei piira, peaks suurim doositase olema valitud nii, et saaks määrata kindlaks peamised sihtorganid ja toksilise toime, põhjustamata siiski kannatusi, ägedat mürgisust, haigestumist või surma. Kõrgeim doositase tuleks üldjuhul valida mürgistusnähtude tekitamiseks, mis võib seisneda näiteks kehakaalu kasvu vähenemises (ligikaudu 10 %). Sellest hoolimata võidakse uuringu eesmärkidest olenevalt (vt punkt 6) valida suurim doos, mis jääb allapoole mürgisust tõendavat doosi, näiteks kui doos avaldab teatavat kahjulikku mõju, kuid siiski ei mõjuta eluiga ega kehakaalu.

25. Doositaseme ja doositasemete intervalli võib valida nii, et määrata kindlaks mõju sõltuvus doosist, ning, olenevalt uuritava kemikaali toimeviisist, täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) või muu soovitud uuringutulemus, näiteks võrdlusdoos (BMD) (vt punkt 27). Asjaolud, mida tuleks väiksemate dooside valimisel arvesse võtta, on toime doosist sõltuvuse eeldatav tõus, doosid, mis võivad põhjustada olulisi metaboliseerimise muutusi või toksilisuse toimemehhanismi muutumist, kui eeldatakse läviväärtuse olemasolu, või mille puhul eeldatakse väikeste dooside ekstrapoleerimise lähtepunkti olemasolu. Kombineeritud kantserogeensuse – kroonilise mürgisuse uuringu tegemisel on peamine eesmärk saada teavet kantserogeensuse riski hindamise jaoks ja teave kroonilise mürgisuse kohta on üldjuhul lisaeesmärk. Seda tuleks uuringu jaoks doositasemete ja doositasemete intervalli valimisel silmas pidada.

26. Doositasemete vahemik sõltub uuringu eesmärkidest ja uuritava kemikaali omadustest ning seda ei saa käesoleva katsemeetodiga üksikasjalikult ette kirjutada, aga kahe- kuni neljakordne vahemik annab sageli häid katsetulemusi, kui seda kasutatakse alanevate doositasemete määramiseks, ning dooside vahel väga suure (näiteks rohkem kui kuue- kuni kümnekordse) vahemiku kasutamise asemel on sageli parem lisada neljas katserühm. Üldiselt tuleks vältida kümnest suurema kordaja kasutamist ja kui seda tehakse, tuleks seda põhjendada.

27. Nagu juhenddokumendis nr 116 (7) on selgitatud, tuleb doosi valimisel arvesse võtta järgmist:

— doosi-toime sõltuvuse teadaolev või oletatav mittelineaarsus või murdepunkt;

— toksikokineetika ja doosipiirkonnad, mille puhul esineb metaboolne induktsioon, küllastumine või väliste ja sisemiste dooside vaheline mittelineaarsus või seda ei esine;

— eellasaine põhjustatud kahjustused, toimemarkerid või märgid sellest, et tuleb arvesse võtta peamiste bioloogiliste alusprotsesside toimumist;

▼M4

— peamised (või oletatavad) toimeviisi asjaolud, näiteks annused, mille juures hakkab suurenema tsütotoksilisus, mõjutatakse hormoonitasemeid, homeostaasi säilitamise mehhanismid saavad üle koormatud jne;

— mõju doosist sõltuvuse kõvera piirkonnad, kus on vaja eriti usaldusväärset hinnangut, näiteks eeldatava võrdlusdoosi (BMD) vahemikus või oletatava läviväärtuse juures;

— inimeste kokkupuute eeldatava tasemega seotud kaalutlused, eriti keskmiste ja väiksemate dooside valimisel.

28. Kontrollrühm on rühm, kellega katseid ei tehta, või kandeaine kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet kõige suuremas koguses, mida kasutatakse doosirühmades. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga ja katseloomad söövad seda sööda halvema maitse tõttu oluliselt vähem, võib asjakohasema kontrollrühma tagamiseks olla sobiv täiendav kontrollrühm, kes saab samapalju sööta, kui doosirühmas ära süüakse.

Dooside ettevalmistamine ja uuritava kemikaali manustamine

29. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu koos sööda või joogiveega või kurgusondiga. Lisateave manustamisteede ja -meetodite kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Manustamistee ja -meetod sõltub uuringu eesmärgist, uuritava kemikaali füüsikalistest ja keemilistest omadustest, biosaadavusest ning inimese uuritava kemikaaliga kokkupuutumise peamisest teest ja viisist. Manustamistee ja -meetodi valikut tuleks põhjendada. Loomade heaolu huvides tuleks suukaudne manustamine kurgusondiga üldiselt valida ainult selliste ainetega, mille puhul see manustamistee ja -meetod on põhjendatult sarnane inimese võimaliku kokkupuutega kemikaaliga (näiteks ravimid). Toidu- või keskkonnakemikaalide puhul, sh pestitsiidide puhul toimub manustamine tavaliselt sööda või joogivee kaudu. Mõne stsenaariumi puhul, näiteks kokkupuude töökohal, võib olla asjakohasem manustada kemikaali muul viisil.

30. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmisi kandeaine ja muude lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotumisele, metaboliseerimisele või retentsioonile; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi, ning mõjud sööda või vee tarbimisele või loomade toitumusele. Soovitatakse, et võimaluse korral tuleks kõigepealt kasutada vesilahust/-suspensiooni, seejärel õlilahust/-emulsiooni (nt maisiõli) ja siis lahustamist muudes kandeainetes. Muu kandeaine kui vee puhul tuleks teada kandeaine mürgiseid omadusi. Tuleks teada uuritava kemikaali stabiilsust ning doseerimislahuste või sööda (nagu on asjakohane) homogeensust manustamise tingimustes (näiteks söödaga).

31. Nende kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Pikas mürgisuse uuringus, kus kemikaali manustatakse sööda kaudu, ei tohiks uuritava kemikaali kontsentratsioon söödas üldiselt olla suurem kui 5 % sööda üldkogusest, et vältida tasakaalustamata toitumist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (mg sööda kg kohta või ppm) või püsivat doositaset looma kehamassi alusel (mg kehakaalu kg kohta), mis arvutatakse iga nädal. Tuleks täpsustada, millist võimalust kasutatakse.

▼M4

32. Suukaudse manustamise korral manustatakse loomadele uuritavat kemikaali iga päev (seitse päeva nädalas) 12 kuu jooksul (kroonilise mürgisuse etapp) või 24 kuu jooksul (kantserogeensuse etapp), vt ka punktid 33 ja 34. Iga muu doseerimismeetodi, nt viis päeva nädalas, kasutamist tuleb põhjendada. Nahakaudse manustamise puhul töödeldakse loomi uuritava kemikaaliga tavaliselt 12 kuu jooksul (kroonilise mürgisuse etapp) vähemalt kuus tundi päevas seitse päeva nädalas, nagu on täpsustatud käesoleva lisa peatükis B.9 (11), või 24 kuu jooksul (kantserogeensuse etapp). Sissehingamise teel toimuv kokkupuude toimub kuus tundi päevas ja seitse päeva nädalas; võib kasutada ka kokkupuudet viiel päeval nädalas, kui see on põhjendatud. Kokkupuuteperiood on tavaliselt 12 kuud (kroonilise mürgisuse etapp) või 24 kuud (kantserogeensuse etapp). Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseliigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Kui päevas kasutatakse alla kuuetunnist kokkupuute kestust, tuleks seda põhjendada. Vt ka käesoleva lisa peatükk B.8 (9).

33. Kui loomadele manustatakse uuritavat kemikaali sundsöötmisega, tuleks seda teha iga päev umbes samal kellaajal maosondi või sobiva intubatsioonikanüüli abil. Üldiselt manustatakse üks annus üks kord päevas; kui aga kemikaal on näiteks lokaalne ärritaja, võib igapäevase doosimäära säilitada, manustades jaotatud annust (kaks korda päevas). Suurim vedelikukogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus peaks olema nii väike kui praktiliselt võimalik ega tohiks üldjuhul näriliste puhul ületada 1 ml kehamassi 100 g kohta (31). Katses kasutatava mahu erinevusi tuleks vähendada miinimumini; püsiva mahu tagamiseks tuleks kõikidel doositasemetel kasutada erinevaid kontsentratsioone. Erandiks on võimaliku söövitava või ärritava mõjuga kemikaalid, mida tuleb tugeva paikse mõju vältimiseks lahjendada. Tuleks vältida katseid kontsentratsioonidel, mis tõenäoliselt võivad seedetrakti söövitada või ärritada.

Uuringu kestus

34. Käesoleva uuringu kroonilise mürgisuse etapi annustamise ajavahemik ja kestus on tavaliselt 12 kuud, kuigi uuringu kava võimaldab teha ka lühemaid (näiteks kuus või üheksa kuud) või pikemaid (näiteks 18 või 24 kuud) uuringuid, olenevalt konkreetsetest eeskirjadest või teatavatest toimemehhanismiga seotud eesmärkidest. Kõrvalekaldeid 12-kuulisest kokkupuute kestusest tuleks põhjendada, eelkõige lühema kestuse puhul. Kõik kõnealusele etapile määratud doosirühmad surmatakse määratud ajal kroonilise mürgisuse ja uudismoodustistega mitteseotud patoloogia hindamiseks. Uuritava kemikaali põhjustatud toksikoloogiliste muutuste pöörduvuse jälgimiseks kasutatavaid satelliitrühmi tuleks pärast kokkupuute lõpetamist hoida ilma annustamiseta vähemalt neli nädalat ja mitte rohkem kui kolmandiku uuringu kogukestusest.

35. Kantserogeensuse uuringu kestus on näriliste puhul tavaliselt 24 kuud, mis moodustab suurema osa kasutatavate loomade tavalisest elueast. Võib kasutada lühemat või pikemat uuringu kestust, olenevalt uuringus kasutatava loomaliigi liini elueast, aga seda tuleks põhjendada. Konkreetsete hiireliinide puhul, näiteks liin AKR/J, C3H/J või C57BL/6J, võib asjakohasem olla 18kuuline kestus. Allpool on esitatud suunised uuringu kestuse ja lõpetamise ning ellujäämuse kohta; täpsemad suunised, sh uuringus ellujäämusega võrreldes negatiivse kantserogeensuse lubatavuse kaalumine, on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

▼M4

— Kui väiksema doosi rühmade või kontrollrühma ellujäänute arv langeb alla 25 %, tuleks kaaluda uuringu lõpetamist.

— Kui mürgistuse tõttu sureb enneaegselt ainult suure doosi rühm, ei tohiks selle pärast uuringut lõpetada.

— Kummagi soo ellujäämust tuleks arvesse võtta eraldi.

— Uuringut ei tohiks pikendada selle ajavahemikuni, kus uuringust saadavad andmed ei ole enam piisavad statistiliselt kehtivate hinnangute andmiseks.

VAATLUSED (KROONILISE MÜRGISUSE ETAPP)

36. Kõiki loomi tuleks haigestumise või suremise suhtes kontrollida, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, sh nädalavahetustel ja pühadel. Vähemalt üks kord päevas tuleks teha üldine kliiniline läbivaatus, eelistatavalt igal päeval samal ajal / samadel aegadel, arvestades kunstliku manustamise puhul eeldatava mõju kõrgperioodi pärast doseerimist.

37. Kõik loomad tuleks üksikasjalikult kliiniliselt läbi vaadata vähemalt kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada iga katselooma seisundi muutumise võrdlusi), uuringu esimese nädala lõpus ja seejärel iga kuu. Vaatlused tuleks korraldada nii, et üksikute vaatlejate vahelised erinevused oleksid minimeeritud ega sõltuks katserühmast. Need vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, eelistatavalt selleks ette nähtud kohas ja iga kord samal ajal. Tulemused tuleks hoolikalt üles märkida, kasutades selleks võimaluse korral katselabori selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et vaatlustingimuste varieeruvus oleks minimaalne. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised tunnused: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestal, eritiste esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus, muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad endaga ümberkäimisele reageerivad, kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi liikumine) (32).

38. Enne uuritava kemikaali esmakordset manustamist tuleks oftalmoskoobi või muu sobiva seadme abil teha kõikide loomade oftalmoloogiline kontroll. Pärast uuringu lõppu tuleks kõnealune kontroll teha eelistatavalt kõikidele loomadele, kuid vähemalt suure doosi rühma ja kontrollrühma loomadele. Kui silmades avastatakse muutusi, tuleb läbi vaadata kõik loomad. Kui struktuurianalüüs või muu teave viitab mürgisusele silmade suhtes, tuleks silmi kontrollida sagedamini.

39. Kui kemikaali varasem korduvannuse 28-päevane ja/või 90-päevane mürgisuse uuring näitas võimalikku neurotoksilist mõju, võib soovi korral enne uuringu algust ja kolmekuuliste ajavahemike järel pärast uuringu algust kuni 12 kuuni (kaasa arvatud) ning samuti uuringu lõpus (kui uuring kestab kauem kui 12 kuud) uurida sensoorset reageerimist erinevat tüüpi stiimulitele (32) (näiteks helilised, visuaalsed ja propriotseptiivsed stiimulid) (33, 34, 35), hinnata haardetugevust (36) ja motoorset tegevust (37). Võimalike meetodite täpsemad üksikasjad on esitatud vastavates viidetes. Siiski võib kasutada ka muid meetodeid kui need, millele viidatakse.

▼M4

40. Sellise kemikaali puhul, mille varasem korduvannuse 28-päevane ja/või 90-päevane mürgisuse uuring näitas immunotoksilise mõju võimalikkust, võib soovi korral teha uuringu lõpul kõnealuse näitaja täiendavaid uuringuid.

Kehamass, sööda ja vee tarbimine ning söödakasutuse tõhusus

41. Kõiki loomi tuleks kaaluda kemikaali manustamise alguses, vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Sööda tarbimist ja söödakasutuse tõhusust tuleks mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ning seejärel vähemalt kord kuus. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Joogivee tarbimise mõõtmisi tuleks kaaluda ka uuringute puhul, milles muutub loomade joomiskäitumine.

Hematoloogia ja kliiniline biokeemia

42. Näriliste uuringutes tuleks hematoloogilised uuringud teha kõikidele katseloomadele (kümme isas- ja kümme emaslooma rühma kohta) kolme, kuue ja 12 kuu möödumisel ning samuti uuringu lõpus (kui uuring kestab kauem kui 12 kuud). Hiirte puhul võib kõikide nõutavate hematoloogiliste näitajate määramiseks minna vaja satelliitloomi (vt punkt 19). Muude loomade kui näriliste uurimisel võetakse proovid väiksemalt arvult loomadelt (koerte uurimisel näiteks neljalt loomalt kummagi soo ja iga rühma kohta) vahepealsetel proovivõtu aegadel ja uuringu lõpus, nagu on kirjeldatud näriliste puhul. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu vältel ei tuvastatud mõju hematoloogilistele parameetritele, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha ei näriliste ega muude loomade puhul. Vereproovid tuleks võtta määratud kohast, näiteks otse südamest või retroorbitaalsest siinusest, kasutades tuimestust.

43. Tuleks uurida järgmisi parameetreid (38): leukotsüütide üldarv ja diferentseeritud leukotsüüdiarvud, erütrotsüütide arv, vereliistakute arv, hemoglobiini kontsentratsioon, hematokrit (rakkude protsent vere üldmahus), erütrotsüütide keskmine maht (MCV), hemoglobiini keskmine kogus erütrotsüüdis (MCH), hemoglobiini keskmine kontsentratsioon erütrotsüüdis (MCHC), protrombiiniaeg ja aktiveeritud osalise tromboplastiini aeg. Vajaduse korral võib mõõta muid hematoloogiaparameetreid, näiteks Heinzi kehakesi või muid atüüpilisi erütrotsüüdivorme või methemoglobiini, olenevalt uuritava kemikaali mürgisusest. Üldiselt tuleks kasutada paindlikku lähenemisviisi sõltuvalt konkreetse uuritava kemikaali puhul täheldatud ja/või eeldatavast mõjust. Kui uuritav kemikaal mõjutab vereloomesüsteemi, võib olla vajalik uurida samuti retikulotsüütide arvu ja luuüdi tsütoloogiat, kuigi need uuringud ei ole alati vajalikud.

44. Olulise kudesid kahjustava toksilise mõju ning eelkõige neerusid ja maksa kahjustava mõju uurimiseks tehakse kliinilise biokeemia analüüsid vereproovidega, mis on võetud kõikidelt katseloomadelt (kümnelt isas- ja kümnelt emasloomalt rühma kohta) samade ajavahemike järel, mis on ette nähtud hematoloogiliste uuringute puhul. Hiirte puhul võib kõikide nõutavate kliinilise biokeemia näitajate määramiseks minna vaja satelliitloomi. Muude loomade kui näriliste uurimisel võetakse proovid väiksemalt arvult loomadelt (koerte uurimisel näiteks neljalt loomalt kummagi soo ja iga rühma kohta) vahepealsetel proovivõtu aegadel ja uuringu lõpus, nagu on kirjeldatud näriliste puhul. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu vältel ei tuvastatud mõju kliinilise biokeemia parameetritele, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha ei näriliste ega muude loomade puhul. Enne vereproovi võtmist on soovitatav loomi

▼M4

(v.a hiired) öö jooksul näljutada ([1]). Tuleks uurida järgmisi parameetreid (38): glükoos, karbamiid (karbamiidlämmastik), kreatiniin, üldvalk, albumiin, kaltsium, naatrium, kaalium, üldkolesterool, vähemalt kaks asjakohast hepatotsellulaarse hindamise katset (alaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, glutamaatdehüdrogenaas, sapphapete kogusisaldus) (39) ja vähemalt kaks asjakohast hepatobiliaarse hindamise katset (aluseline fosfataas, γ-glutamüültransferaas, 5'-nukleotidaas, üldbilirubiini, sapphapete kogusisaldus) (39). Muid kliinilisi keemilisi parameetreid, näiteks triglütseriide paastutingimustes, teatavaid hormoone ja koliinesteraasi võib mõõta vastavalt vajadusele, olenevalt uuritava kemikaali mürgisusest. Üldiselt on vaja paindlikku lähenemisviisi sõltuvalt uuritava kemikaali täheldatud ja/või oletatavast mõjust.

45. Uriinianalüüsi näitajad tuleks määrata kõikidel katseloomadel (kümnel isas- ja kümnel emasloomal rühma kohta) proovidest, mis on kogutud samade vahemikega kui hematoloogia- ja kliinilise keemia proovid. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu ajal ei leitud uriinianalüüsil mingit mõju, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha. Kliinilise patoloogia uuringute eksperdi soovituse (38) kohaselt tuleks määrata järgmised parameetrid: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, üldvalk ja glükoos. Lisaks võib määrata ketoone, urobilinogeeni, bilirubiini ja peitverd. Kui täheldatud mõju on vaja laialdasemalt uurida, võib vajaduse korral määrata täiendavaid näitajaid.

46. Üldiselt arvatakse, et hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate lähteväärtused on vaja enne kemikaali manustamist määrata koertega tehtavate uuringute puhul, kuid närilistega tehtavate uuringute puhul neid määrata vaja ei ole (38). Kui varem määratud lähteväärtused (vt punkt 58) ei ole õiged, tuleks kaaluda selliste väärtuste määramist.

PATOLOOGIA

Täielik lahkamine

47. Kõik uuringus kasutatud loomad läbivad tavaliselt täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Siiski võib ka ette näha, et mõõtmised piirduvad (vahepeal surmatud või satelliitrühma loomade puhul) kõige olulisemate, näiteks neurotoksilisuse või immunotoksilisuse näitajate määramisega (vt punkt 21). Selliseid loomi ei ole vaja lahata ja nendega teha järgmistes punktides kirjeldatud protseduure. Kontroll-loomade puhul võib uuringu juht konkreetsel juhul otsustada, kas lahkamine on vajalik.

([1]) Mitmete seerumi ja plasma, eelkõige glükoosi mõõtmiste korral oleks eelistatav loomadele eelneva öö jooksul süüa mitte anda. Selle peamine põhjendus on see, et söötmise korral oleks tulemuste varieeruvus suurem ning see varjaks raskemini tuvastatava toime ning muudaks tõlgendamise raskeks. Kuid tuleb märkida, et öö läbi söötmata hoidmine võib häirida loomade tavalist üldist ainevahetust ja eelkõige söödaga manustamise uuringute puhul võib see häirida igapäevast kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Kõiki loomi tuleks hinnata samas füsioloogilises seisundis ja seepärast tuleks üksikasjalikud või neuroloogilised hindamised määrata muule päevale kui kliinilise biokeemia proovide võtmise päev.

▼**M4**

48. Kõikide loomade puhul, v.a loomad, kellele on tehtud erand punkti 47 viimases osas, tuleks määrata organite mass. Kõigi loomade (välja arvatud loomad, kes leitakse suremas ja/või surmatakse uuringu kestel) neerupealised, aju, munandimanused, süda, neerud, maks, munasarjad, põrn, munandid, kilpnääre (mis kaalutakse pärast fikseerimist koos kõrvalkilpnäärmetega) ja emakas tuleks puhastada kõigist nende küljes olevatest kudedest, nagu on asjakohane, ja kaaluda märjalt võimalikult kiiresti pärast lahkamist, et vältida organite kuivamist.

49. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 40) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskkonnas (kandilistes sulgudes esitatud organite uuring ei ole kohustuslik):

Kõik silmaga nähtavad kahjustused	Süda	Kõhunääre	Magu (eesmagu, mao näärmeline osa)
Neerupealis	Niudesool	Kõrvalkilpnääre	[Hambad]
Aort	Tühisool	Perifeerne närv	Munandid
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/sild)	Neerud	Ajuripats	Harknääre
Umbsool	Pisaranääre (eksorbitaalne)	Eesnääre	Kilpnääre
Emakakael	Maks	Pärasool	[Keel]
Koagulatsiooninääre	Kops	Süljenääre	Hingetoru
Käärsool	Lümfisõlmed (nii pealispinnalt kui ka sügavalt)	Seemnepõiekesed	Kusepõis
Kaksteistsõrmiksool	Piimanääre (kohustuslik emaste puhul ja kui see on nähtavalt lõigatav, siis isaste puhul)	Skeletilihas	Emakas (sh emakakael)
Munandimanus	[Ülemised hingamisteed, sh nina, ninakarbikud ja nina kõrvalkoopad]	Nahk	[Kusejuha]
Silm (sh võrkkest)	Söögitoru	Seljaaju (kolmel tasandil: kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)	[Kusiti]
[Reieluu koos liigesega]	[Haistmissibul]	Põrn	Tupp
Sapipõis (muud liigid kui rott)	Munasarjad	[Rinnak]	Luuüdi lõige ja/või värske luuüdi aspiraat
Harderi nääre			

▼M4

Paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks säilitada mõlemad organid. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid. Nahakaudse manustamise uuringute puhul tuleks uurida neid organeid, mis on ette nähtud suukaudse manustamise puhul, ning väga vajalik on manustamiskohast nahaproovide võtmine ja säilitamine. Inhalatsiooniuuringute korral tuleks hingamisteedest säilitatavate ja uuritavate kudede puhul järgida käesoleva lisa peatükkide B.8 (9) ja B.29 (10) soovitusi. Muude organite/kudede puhul (ja lisaks hingamisteedest pärit konkreetselt säilitatavatele kudedele) tuleks järgida suukaudse manustamise puhul esitatud organite nimekirja.

Histopatoloogia

50. On avaldatud juhendid toksikoloogilise patoloogia uuringute tegemise parimate tavade kohta (40). Tuleb teha vähemalt järgmised histopatoloogilised uuringud:

— suure annuse ja kontrollrühmade loomade kõik koed;

— uuringu vältel surnud või surmatud loomade kõik koed;

— kõik koed, milles täheldatakse makroskoopilisi anomaaliaid;

— sihtkoed või koed, mille puhul suure annuse rühmas on näha kokkupuutest tingitud muutusi, kõikidelt suure annuse rühmade loomadelt;

— paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks uurida mõlemat organit.

VAATLUSED (KANTSEROGEENSUSE FAAS)

51. Kõiki loomi tuleks haigestumise või suremise suhtes kontrollida, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, sh nädalavahetustel ja pühadel. Loomi tuleks samuti kord päevas kontrollida toksikoloogiliselt oluliste nähtude suhtes. Sundtoitmisega uuringute puhul tuleks loomi kontrollida vahetult doosi manustamisele järgneval ajavahemikul. Erilist tähelepanu tuleks pöörata kasvajate tekkimisele; iga nähtava või palpeeritava tuumori kohta tuleb märkida ilmumise aeg, paiknemine, mõõtmed, välimus ja areng.

52. Kõiki loomi tuleks kaaluda kemikaali manustamise alguses, vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Sööda tarbimist ja söödakasutuse tõhusust tuleks mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ning seejärel vähemalt kord kuus. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Joogivee tarbimise mõõtmisi tuleks kaaluda ka uuringute puhul, milles muutub loomade joomiskäitumine.

▼**M4**

Hematoloogilised, kliinilise biokeemia ja muud mõõtmised

53. Uuringust saadava teabe, eelkõige toimeviisiga seotud teabe maksimeerimiseks tuleks uuringu juhi äranägemise järgi võtta hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia analüüside jaoks vereproove. Samuti võib olla asjakohane uriinianalüüsi tegemine. Kõnealuste parameetrite kohta saab teavet kroonilise mürgisuse etapis, mille kestus on tavaliselt 12 kuud (punkt 34), kasutatud loomade andmetest. Täpsemad juhendid kantserogeensuse uuringu käigus kõnealuste proovide võtmise väärtuse kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Kui vereproovid võetakse, tuleb seda teha katseperioodi lõpus vahetult enne loomade tapmist või selle käigus. Vereproovid tuleks võtta määratud kohast, näiteks otse südamest või retroorbitaalsest siinusest, kasutades tuimestust. Uurimiseks võib samuti valmistada vere äigepreparaadid, eelkõige juhul, kui luuüdi näib olevat sihtorgan, kuigi kantserogeensuse etapil vere äigepreparaatide uurimise väärtus kantserogeense/onkogeense mõju hindamiseks on küsitav (38).

PATOLOOGIA

Täielik lahkamine

54. Kõik uuringus kasutatud loomad, v.a kontroll-loomad (vt punkt 20) ja muud satelliitrühma loomad, läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Kontroll-loomade ja muude satelliitrühma loomade puhul võib uuringu juht konkreetsel juhul otsustada, kas lahkamine on vajalik. Organite massi kantserogeensuse uuringutes tavaliselt ei määrata, kuna geriaatrilised muutused ja hilisematel etappidel kasvajate areng piirab organite massi andmete kasulikkust. Kõnealused andmed võivad siiski olla üliolulised tõendusmaterjali kaalukuse hindamisel ja eelkõige toimeviisi hindamisel. Kui satelliituuringus seda määratakse, tuleks kõnealused andmed koguda hiljemalt aasta möödumisel uuringu algusest.

55. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 40) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskkonnas (kandilistes sulgudes esitatud organite uuring ei ole kohustuslik):

Kõik silmaga nähtavad kahjustused	Süda	Kõhunääre	Magu (eesmagu, mao näärmeline osa)
Neerupealis	Niudesool	Kõrvalkilpnääre	[Hambad]
Aort	Tühisool	Perifeerne närv	Munandid
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/sild)	Neerud	Ajuripats	Harknääre
Umbsool	Pisaranääre (eksorbitaalne)	Eesnääre	Kilpnääre
Emakakael	Maks	Pärasool	[Keel]
Koagulatsiooninääre	Kops	Süljenääre	Hingetoru
Käärsool	Lümfisõlmed (nii pealispinnalt kui ka sügavalt)	Seemnepõiekesed	Kusepõis

▼M4

Kaksteistsõrmiksool	Piimanääre (kohustuslik emaste puhul ja kui see on nähtavalt lõigatav, siis isaste puhul)	Skeletilihas	Emakas (sh emakakael)
Munandimanus	[Ülemised hingamisteed, sh nina, ninakarbikud ja nina kõrvalkoopad]	Nahk	[Kusejuha]
Silm (sh võrkkest)	Söögitoru	Seljaaju (kolmel tasandil: kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)	[Kusiti]
[Reieluu koos liigesega]	[Haistmissibul]	Põrn	Tupp
Sapipõis (muud liigid kui rott)	Munasarjad	[Rinnak]	Luuüdi lõige ja/või värske luuüdi aspiraat
Harderi nääre			

Paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks säilitada mõlemad organid. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid. Nahakaudse manustamise uuringute puhul tuleks uurida neid organeid, mis on ette nähtud suukaudse manustamise puhul, ning väga vajalik on manustamiskohast nahaproovide võtmine ja säilitamine. Inhalatsiooniuuringute korral tuleks hingamisteedest säilitatavate ja uuritavate kudede puhul järgida käesoleva lisa peatükkide B.8 (8) ja B.29 (9) soovitusi. Muude organite/kudede puhul (ja lisaks hingamisteedest pärit konkreetselt säilitatavatele kudedele) tuleks järgida suukaudse manustamise puhul esitatud organite nimekirja.

Histopatoloogia

56. On avaldatud juhendid toksikoloogilise patoloogia uuringute tegemise parimate tavade kohta (40). Tuleb teha vähemalt järgmised histopatoloogilised uuringud:

— suure annuse ja kontrollrühma loomade kõik koed;

— uuringu vältel surnud või surmatud loomade kõik koed;

— kõik koed, milles täheldatakse makroskoopilisi anomaaliaid, kaasa arvatud kasvajad;

— kui suure doosi rühmas täheldatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogilisi muutusi, kontrollitakse kõikide muude doosirühmade loomadel samu kudesid;

— paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks uurida mõlemat organit.

▼**M4**

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE (KANTSEROGEENSUS JA KROONILINE MÜRGISUS)

Andmed

57. Kõigi hinnatavate parameetrite kohta tuleks esitada iga looma andmed. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arv, mürgistusnähtudega loomade arv, täheldatud mürgistusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise toime ilmnemine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta nende loomade protsent, kellel seda esines. Kokkuvõtlikes tabelites tuleks esitada (pidevalt mõõdetud katseandmete puhul) nende loomade keskmised ja standardhälbed, kellel täheldati mürgisuse mõju või kahjustusi, lisaks kahjustuse raskusastme määramisele.

58. Varasemad kontrolli andmed võivad aidata uuringu tulemusi tõlgendada, näiteks kui samaaegse kontrolli andmed erinevad oluliselt sama katsekorralduse juures kontrollrühma loomadelt saadud hiljutistest andmetest. Hindamiseks võetud varasemad kontrolli andmed peaksid pärinema samast laborist, olema saadud sama vanuserühma ja sama liini loomadega ning olema kogutud kõnealusele uuringule eelneva viie aasta jooksul.

59. Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistilised meetodid ja analüüsitavad andmed tuleks valida uuringu kavandamise etapis (punkt 9). Sellisel valimisel tuleks vajaduse korral ette näha, et tulemusi tuleb kohandada ellujäämise määra arvestamiseks.

60. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline olemus, puhtus ja füüsikalis-keemilised omadused;

— tunnusandmed;

— kemikaali päritolu;

— partii number;

— keemilise analüüsi sertifikaat.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;

— loomade arv, vanus ja sugu katse alguses;

— päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

— iga looma kaal katse alguses.

▼M4

Katsetingimused:

— manustamistee ja annuse valiku põhjendus;

— kui see on kohaldatav, siis andmete analüüsimiseks valitud statistilised meetodid;

— andmed uuritava kemikaali preparaadi/sööda valmistamise kohta;

— analüüsiandmed preparaadis saavutatud kontsentratsiooni, preparaadi stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

— manustamistee ja uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— inhalatsiooniuuringute puhul: kas manustamine toimub ainult nina või kogu keha kaudu;

— tegelik doos (mg kehakaalu kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur söödas või joogivees oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (mg/kg või ppm) ja tegeliku doosi vahel;

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Tulemused (tuleks esitada kokkuvõtlikud tabelandmed ja andmed eraldi iga looma kohta)

Üldosa:

— ellujäämuse andmed;

— kehamass / kehamassi muutused;

— sööda tarbimine, söödakasutuse tõhususe arvutused (kui need tehti) ja vee tarbimine (kui on kohaldatav);

— toksiko-kineetilised andmed võimaluse korral;

— oftalmoskoopia võimaluse korral;

— hematoloogia andmed võimaluse korral;

— kliinilise keemia andmed võimaluse korral.

Kliinilised leiud:

— toksilisuse tunnused;

— iga anomaalia esinemissagedus (ja kui määrati, siis raskusaste);

— kliiniliste ilmingute laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas ilmingud on ajutised või püsivad).

Lahanguandmed:

— kehamass surmamisel;

— organite mass (ja kui võimalik, siis organi massi / kehamassi suhe);

— lahkamise leiud; anomaaliate esinemissagedus ja raskusaste.

Histopatoloogia:

— uudismoodustistega mitteseotud histopatoloogilised leiud;

— uudismoodustistega seotud histopatoloogilised leiud;

▼M4

— korrelatsioon makroskoopiliste ja mikroskoopiliste leidude vahel;

— kõigi kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus koos raskusastme hindamisega;

— aruanne mikroskoobipreparaatide võimalike vastastikuste hindamiste kohta.

Vajaduse korral tulemuste statistiline töötlus.

Tulemuste arutelu:

— võimaliku modelleerimislähenemisviisi arutelu;

— toime sõltuvus doosist;

— varasemad kontrolli andmed;

— võimalikku toimeviisi käsitleva teabe analüüsimine;

— võrdlusdoosi (BMD), täheldatava kahjuliku toimeta doosi (NOAEL) või vähima täheldatava kahjuliku toimega doosi (LOAEL) kindlaksmääramine;

— asjakohasus inimeste puhul.

Järeldused

KIRJANDUS

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

6) Käesoleva lisa peatükk B.27 „Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenäriliste puhul”.

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Käesoleva lisa peatükk B.8 „Subakuutne mürgisus sissehingamisel: 28-päevane uuring”.

10) Käesoleva lisa peatükk B.29 „Subkrooniline mürgisus sissehingamisel: 90-päevane uuring”.

11) Käesoleva lisa peatükk B.9 „Kordusdoosi mürgisus (28 päeva, nahakaudne)”.

▼M4

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1–7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9–35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37–68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69–98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) 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.

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279–284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196–1203.

▼**M4**

27) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15–23.

32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

39) EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼B

B.34. **ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONITOKSILISUSE UURING**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritavat ainet manustatakse gradueeritud annustes mitmele isas- ja emasloomade rühmale. Isasloomadele tuleks ainet manustada kasvuperioodil ja vähemalt ühe täieliku spermatogeneesi tsükli (ligikaudu 56 päeva hiirel ja 70 päeva rotil) vältel, et võimaldada ükskõik milliste uuritava aine poolt tekitatavate ebasoovitavate kõrvalmõjude toimimist spermatogeneesile.

Emasloomadele tuleks uuritavat ainet manustada vähemalt kahe täieliku innatsükli vältel, et võimaldada ükskõik milliste uuritava aine poolt tekitatavate ebasoovitavate kõrvalmõjude toimimist östrusele. Seejärel loomad paaritatakse. Uuritavat ainet manustatakse mõlemast soost loomadele paaritumisperioodi jooksul, seejärel ainult emasloomadele tiinuse ja imetamisperioodi vältel. Uuritava aine manustamiseks inhalatsioonina tuleb meetodit modifitseerida.

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. UURINGUMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. *Ettevalmistused*

Enne uuringu algust jagatakse terved katseloomad juhuslikkuse alusel kontroll- ja katserühmadesse. Loomi peetakse eksperimentaalsetes söötmis- ja pidamistingimustes vähemalt viie päeva vältel enne uuringu algust. On soovitatav, et uuritavat ainet manustatakse söödas või joogivees. Teised manustamisviisid on samuti aktsepteeritavad. Kõigile loomadele tuleks manustada uuritavat ainet kogu katseperioodi vältel samal meetodil. Kui manustamise lihtsustamiseks kasutatakse vehiiklit või mõnda muud lisandit, peaks olema teada, et need ei oma toksilisi toimeid. Aine manustamine peaks toimuma kõigil seitsmel nädalapäeval.

▼B

1.6.2. *Katseloomad*

Liikide valik

Eelistatud liikideks on rott ja hiir. Kasutada tuleks terveid loomi, keda pole varem rakendatud mingites katseprotseduurides. Madala viljakusega liine ei tohiks kasutada. Katseloomi iseloomustatakse liigi, liini, soo, kaalu ja/või vanuse järgi.

Viljakuse adekvaatseks hindamiseks tuleks uurida nii isas- kui emasloomi. Kõik katse- ja kontroll-loomad peaksid olema enne uuringu algust võõrutatud.

Arv ja sugu

Igas katse- ja kontrollrühmas peaks olema piisavalt loomi, et tulemuseks oleks umbes 20 lõpptiinet emaslooma.

Eesmärgiks on piisava hulga tiinuste ja järglaste saamine, et kindlustada aine potentsiaalsete mõjude tähendusrikas hindamine viljakusele, tiinusele, emaslooma käitumisele P generatsioonis, imetamisele, ning F_1 järglaste kasvule ja arengule viljastumisest suguküpsuseni.

1.6.3. *Katsetingimused*

Sööta ja vett peaks katseloomadele võimaldama *ad libitum*. Poegimise lähenedes tuleks tiined emased paigutada eraldi poegimis- või pesapuuridesse, kuhu neile võib paigutada ka pesategemiseks sobivaid materjale.

1.6.3.1. Annused

Uuringus tuleks kasutada vähemalt kolme katserühma ja kontrollrühma. Kui uuritava aine annustamiseks kasutatakse vehiiklit, tuleks seda kontrollrühmale manustada selle kõige suuremas kasutatavas koguses. Kui uuritav aine põhjustab söödatarbimise või söödakasutuse langust, võib osutuda vajalikuks paralleelselt söödetava kontrollrühma kasutamine. Ideaalselt, kui seda ei piira uuritava aine keemilised, füüsikalised või bioloogilised omadused, peaks kõrgeim doos põhjustama toksilisuse nähte, kuid mitte suremust vanemate (P) põlvkonna loomadel. Keskmine annus või annused peaksid põhjustama minimaalseid uuritavale ainele omistatavaid toksilisuse nähte ja madalaim annus ei tohiks põhjustada mingeid märgatavaid ebasoovitavaid uuritavale ainele omistatavaid toimeid ei vanematel ega järglastel. Kui manustamine toimub soni abil või kapslitena, peaks iga looma individuaalne annus põhinema tema kehamassil ja seda tuleks igal nädalal kohandada vastavalt kehakaalu muutustele. Emasloomade annus võib tiinuse ajal soovi korral põhineda nende kehamassil tiinuse 0- või 6. päeval.

1.6.3.2. Piirsisalduskatse

Madala toksilisusega ainete puhul ei pruugi katsed teiste annustega vajalikuks osutuda, kui vähemalt 1 000 mg/kg annuse juures ei ilmne mingeid tunnuseid reproduktiivfunktsioonide häirumisest. Kui eelnevast uuringust suurte annuste tasemel, kindlate toksilisuse tunnustega emasloomal, ei nähtu mingeid ebasoovitavaid toimeid viljakusele, ei pruugi katsed teiste annustega vajalikuks osutuda.

▼B

1.6.3.3. *Katse tegemine*

K a t s e g r a a f i k u d

Uuritava aine igapäevast manustamist vanemate (P) põlvkonna isasloomadele tuleks alustada, kui nad on umbes viie kuni üheksa nädala vanused, pärast võõrutamist ja aklimatiseerimist vähemalt viie päeva vältel. Rottide puhul jätkatakse manustamist 10 nädala jooksul enne paaritamisperioodi (hiirte puhul 8 nädalat). Isasloomad tuleks hukata ja uurida pärast paaritusperioodi lõppu, või, teise võimalusena, võib isasloomi pidada katseratsioonil võimaliku teise pesakonna produtseerimiseni ning hukata ja uurida mingil ajaperioodil enne uuringu lõppu. Uuritava aine manustamine vanemate (P) põlvkonna emasloomadele peaks algama pärast vähemalt viie päeva pikkust aklimatisatsiooniperioodi ja vältama paaritamise eelselt vähemalt kaks nädalat. Uuritava aine igapäevane manustamine P emasloomadele peaks jätkuma kolmenädalase paaritumisperioodi, tiinuse ja imetamise vältel kuni F_1 järglaste võõrutamiseni. Annustamisskeemi modifitseerimist tuleks kaaluda juhtudel, kui uuritava aine kohta on lisaandmeid, näiteks aine metabolismi või bioakumulatsiooni puudutavat teavet.

P a a r i t u s p r o t s e d u u r

Viljakust mõjutava toksilisuse uurimustes võib kasutada kas 1:1 (üks isane ühe emase kohta) või 1:2 (üks isane kahe emase kohta) paaritusi.

1:1 paaritusel korral tuleks üks emane panna kokku sama isasega kuni tiinuse ilmnemise või kolme nädala möödumiseni. Igal hommikul tuleks emasloomi uurida sperma või tupekorkide avastamiseks. Tiinuse 0-päevaks loetakse päeva, mil leitakse sperma või tupekork.

Katseloomi, kes ei paaritu, tuleks uurida eeldatava viljatuse põhjuste kindlaks tegemiseks.

See võib hõlmata selliseid protseduure, nagu lisavõimalused paaritumiseks teiste tõestatud viljakusega emas- või isasloomadega, suguorganite mikroskoopiline uurimine ja innatsüklite või spermatogeneesi uurimine.

P e s a k o n d a d e s u u r u s e d

Viljakuse uurimuses kasutatavatel loomadel võimaldatakse poegida normaalsel viisil ja kasvatada järglasi kuni võõrutamiseni ilma pesakondade standardiseerimiseta.

Kui kasutatakse standardiseerimist, on soovitav rakendada allpool toodud protseduuri. 1. ja 4. poegimisjärgse päeva vahel võib iga pesakonna suurust korrigeerida, eemaldades valikuliselt liigsed pojad nii, et tulemuseks oleks võimalikult täpselt neli emast ja neli isast pesakonna kohta.

Kui emaste või isaste poegade arv ei võimalda koostada pesakonda neljast kummastki soost pojast, on sobiv ka osaline korrigeerimine (nt viis isast ja kolm emast). Korrigeerimine ei ole kohaldatav pesakondadele, kus on vähem kui kaheksa poega.

▼B

1.6.4. Jälgimine

Kogu uurimisperioodi vältel tuleks katseloomi jälgida vähemalt kord päevas. Registreerida tuleks asjakohased käitumise muutused, raske või pika poegimise tunnused ja kõik toksilisusele viitavad tunnused, sealhulgas suremus. Paaritamiseelse ja paaritamisperioodi vältel tuleks söödatarbimist mõõta kord nädalas. Soovi korral võib tiinuse jooksul iga päev mõõta söödatarbimist. Pärast poegimist ja imetamise jooksul tuleks söödatarbimist mõõta samal päeval, kui toimub pesakondade kaalumine. P emaseid ja isaseid loomi tuleks kaaluda annustamise esimesel päeval ja seejärel kord nädalas. Need tähelepanekud tuleks registreerida iga looma kohta individuaalselt.

Tiinusperioodi kestus tuleks arvutada tiinuse 0-päeva aluseks võttes. Iga pesakonda tuleks pärast sündi võimalikult ruttu uurida, et teha kindlaks poegade arv ja sugu, surnultsünnid, elussünnid ja tugevate kõrvalekallete olemasolu.

Surnud ja 4. päeval hukatud pojad tuleks säilitada ja uurida võimalike defektide avastamiseks. Elusad pojad tuleks loendada ja pesakonnad kaaluda sünnijärgsel hommikul, 4. ja 7. päeval ja seejärel kord nädalas kuni uuringu lõpuni, mil loomi kaalutakse individuaalselt.

Emasloomal ja poegadel täheldatud käitumuslikud või füüsilised kõrvalekalded tuleb registreerida.

1.6.5. Patoloogia

1.6.5.1. Lahang

Pärast surma või hukkamist tuleks kõiki P generatsiooni loomi mikroskoopiliselt uurida tuvastamaks mistahes ehituslikke kõrvalekaldeid või patoloogilisi muutusi, pöörates erilist tähelepanu sigimisorganitele. Surnud või surevaid poegi tuleks uurida defektide tuvastamiseks.

1.6.5.2. Histopatoloogia

Kõigi P generatsiooni katseloomade munasarjad, emakas, emakakael, tupp, munandid, munandimanused, seemnepõied, teised lisasugunäärmed, eesnääre, hüpofüüs ja sihtorgan(id) tuleb säilitada mikroskoopiliseks uurimiseks. Juhul, kui neid organeid pole uuritud teistes hulgiannustega uuringutes, tuleks neid mikroskoopiliselt uurida kõigil suurimat annust saanud ja kontrollrühma loomadel, paaritamiseks valitud loomadel, ja kui see on teostatav, siis ka loomadel, kes surid uuringu vältel.

Kõrvalekallete avastamisel organites, tuleks samu organeid uurida ka teistesse annuserühmadesse kuulunud loomadel. Nendel juhtudel tuleks mikroskoopiline uurimine läbi viia kõigi kudede puhul, milles ilmnevad makroskoopilised patoloogilised muutused. Nagu on soovitatud alajaotuses „Paaritusprotseduur”, võib mikroskoopilisele uurimisele allutada ka sigimatuses kahtlustatavate katseloomade sigimisorganid.

▼B

2. **ANDMED**

Andmed tuleks võtta kokku tabeli vormis, näidates iga katserühma kohta loomade arvu uuringu alguses, tiinete loomade arvu, muutuste tüübi ja iga tüüpi muutuse puhul nende loomade suhtarv, kellel see esines.

Võimaluse korral tuleks arvuliste tulemuste hindamiseks kasutada sobivat statistilist meetodit. Kasutada võib ükskõik millist üldiselt aktsepteeritud statistilist meetodit.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud liik/liin;

— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa, kaasa arvatud viljakuse, tiinuse ja elulemuse indeksid;

— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni;

— tabelina esitatud iga pesakonna kaal, poja keskmine kehamass ja poegade individuaalsed kehamassid hukkamisel;

— toksilised või muud mõjud sigivusele, järglastele ja sünnijärgsele kasvule;

— iga kõrvalekalde täheldamise päev ja selle edasine areng;

— paaritamiseks valitud P loomade kehamassi andmed;

— lahanguleiud;

— kõigi mikroskoopiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— tulemuste statistiline töötlus, vajaduse korral;

— tulemuste arutelu;

— tulemuste tõlgendamine.

3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. **VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B

B.35. **KAHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONI TOKSILISUSE UURING**

1. **MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 416 (2001).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev kahe põlvkonna reproduktsiooni uurimise meetod on välja töötatud selleks, et pakkuda üldist teavet katseaine mõjude kohta isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemide rikkumatusele ja toimimisele, kaasa arvatud sugunäärmete funktsioonile, innatsüklile, paaritumiskäitumisele, viljastumisele, tiinusele, poegimisele, imetamisele ja võõrutamisele, ning teavet järglase kasvu ja arengu kohta. Uurimus võib pakkuda teavet ka katseaine mõjude kohta vastsündinu haigestumisele, suremusele ning anda esialgseid andmeid sünnieelse ja sünnijärgse arengutoksilisuse kohta ja võib juhendada järgmiste katsete tegemist. Lisaks F_1-põlvkonna kasvu ja arengu uurimisele on käesolev katsemeetod samuti mõeldud nii F_2-põlvkonna isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemide rikkumatuse ja toimimise kui ka kasvu ja arengu hindamiseks. Arengutoksilisust ja funktsionaalseid puudujääke käsitleva täiendava teabe puhul saab käesolevasse protokolli lisada kas täiendavaid osauurimusi, vajadusel pidada nõu arengutoksilisust ja/või arenguga seotud neurotoksilisust käsitlevate meetodite üle või saab neid lõpp-punkte uurida eraldi uurimustes, kasutades sobivaid katsemeetodeid.

1.2. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Katseainet manustatakse gradueeritud annustena mitmetele isas- ja emasloomade rühmadele. P-põlvkonna isasloomadele tuleks annustada kasvu ajal ja vähemalt ühe täieliku spermatogeneesi tsükli jooksul (hiirtel ligikaudu 56 päeva ja rottidel 70 päeva), et tekitada spermatogeneesile kahjulikke mõjusid. Mõju spermale määratakse kindlaks mitmete spermaparameetrite (nt sperma morfoloogia ja liikuvus) ning koepreparaatide ja üksikasjalike histopatoloogiliste uurimuste abil. Kui spermatogeneesi käsitlevad andmed on olemas varasemast, korduvaid annuseid kasutavast uurimusest, mille kestus on piisav, nt 90päevane uurimus, ei ole vaja lisada hindamisse P-põlvkonna isasloomi. On siiski soovitav, et P-põlvkonna spermaproove või digitaalseid salvestusi säilitatakse hilisema hindamise tarbeks. P-põlvkonna emasloomadele tuleks annustada katseainet kasvu ajal ja mitme täieliku innatsükli käigus, et tuvastada katseaine võimalikud kahjulikud mõjud tavapärasele innatsüklile. Katseainet manustatakse järglaste vanematele (P) nende paaritumise ajal, tiinuste ajal ja kuni F_1-järglase võõrutamiseni. Võõrutamise ajal jätkatakse aine manustamist F_1-järglastele ajal, mil nad arenevad täiskasvanuteks, paaritumise ajal ja F_2-põlvkonna poegimise järel kuni võõrutamiseni.

Kliinilisi vaatlusi ja patoloogilisi uuringuid viiakse läbi kõikidel loomadel mürgisuse sümptomite tuvastamiseks, eriline tähelepanu on mõjudel isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemide rikkumatusele ja toimimisele ning järglase kasvule ja arengule.

▼B

1.3. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.3.1. **Loomaliikide valik**

Eelistatud loomaliik on rott. Kui kasutatakse muid liike, tuleks seda põhjendada ja asjaomased mugandused on vajalikud. Liine, kellel on madal sigivus või kellel teatakse olevat arenguhäireid, ei tohiks kasutada. Uuringut alustades peaks loomade massi muutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada 20 % kummagi soo keskmisest massist.

1.3.2. **Loomade pidamise ja toitmise tingimused**

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3°). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitavalt ei tohiks ületada 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal, siis eesmärgiks on hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatu hulga joogiveega. Toiduvalikut võib mõjutada vajadus tagada katseaine sobiv lisamine, kui katseainet manustatakse käesoleva meetodi abil.

Loomi võib hoida eraldi või väikestes, samast soost loomade rühmades. Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud puurides. Kui võib tõdeda, et suguühe on toimunud, pannakse paaritunud emasloomad oma poegimis- või poegimispuuridesse. Paaritunud rotte võib samuti pidada väikestes rühmades ja eraldatakse üksteisest üheks või kaheks päevaks enne sünnitamist. Paaritunud loomadele antakse sünnituse lähenedes sobivad ja kindlaksmääratud pesapunumismaterjalid.

1.3.3. **Loomade ettevalmistamine**

Tuleks kasutada terveid täiskasvanud loomi, keda on harjutatud laboritingimustega vähemalt 5 päeva ja keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomade liik, liin, päritolu, sugu, kaal ja/või vanus on äratuntavad. Teadma peaks õe-venna suhteid loomade vahel, et vältida õdede-vendade paaritamist. Loomad määratakse juhuvaliku teel kontroll- ja katserühmadesse (kihistamine kehamassi järgi on soovitav). Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Igale loomale tuleks anda ainulaadne tunnusnumber. P-põlvkonna puhul tuleks seda teha enne annustamise algust. F_1-põlvkonna puhul tuleks seda teha paaritumiseks valitud loomade võõrutamisel. F_1-sugupõlve kõikide valitud loomade puhul säilitatakse andmed pesakonna kohta, millest nad pärit on. Lisaks sellele soovitatakse identifitseerida pojad individuaalselt nii ruttu pärast sündi kui võimalik, kui poegi kaalutakse või tehakse muid funktsionaalseid katseid.

P-põlvkonna vanemad on ligikaudu 5–9 nädalat vanad annustamise alguses. Kõikide katserühmade loomad peaksid niipalju kui võimalik olema ühesuguse kaalu ja vanusega.

▼B

1.4. KATSE KÄIK

1.4.1. **Loomade arv ja sugu**

Igas katse- ja kontrollrühmas on piisav arv loomi, et katsesse saadakse eelistatult mitte vähem kui 20 tiinet emaslooma, kes on poegimas või hakkavad varsti poegima. Ainete puhul, mis põhjustavad käsitlemisega seotud soovimatuid mõjusid (nt steriilsus, liigne mürgisus suure annuse juures), ei ole see võimalik. Eesmärgiks on luua piisavalt tiinuse juhtumeid, et kindlustada sellise aine tähendusrikas hindamine, millel on võime mõjutada viljakust, tiinust ja ema käitumist ning imetamist, F_1-järglase kasvu ja arengut viljastumisest kuni suguküpseks saamiseni ning nende järglaste (F_2) arengut kuni võõrutamiseni. Seetõttu, kui ei saada soovitud arvu tiineid loomi (s.t 20 looma), ei tähenda see, et katse on ilmtingimata invaliidne. Katse valiidsust hinnatakse iga üksikjuhtumi puhul eraldi.

1.4.2. **Dooside valmistamine**

On soovitav, et katseainet manustatakse suu kaudu (toidu ja joogivee kaudu või sondi abil), välja arvatud juhul, kui muud manustamisviisi (nt naha kaudu või sissehingamine) peetakse sobivamaks.

Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse katseaine sobivas kandeaines. On soovitav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ja siis võimalikku muude kandealuste lahust. Veest erinevate kandeainete puhul peaks kandeaine toksikoloogilised omadused teada olema. Katseaine stabiilsus kandeaines määratakse kindlaks.

1.4.3. **Annustamine**

Tuleks kasutada vähemalt kolme annusemäära ja samaaegset kontrolli. Kui katseaine füüsikalis-keemiline laad või bioloogilised mõjud ei sea piiranguid, valitakse suurim annusemäär selliselt, et põhjustab mürgisust, kuid ei põhjusta surma ega raskeid kannatusi. Ootamatu suremuse korral on tavaliselt siiski aktsepteeritavad sellised uuringud, milles P-sugupõlve vanemate suremus on ligikaudu alla 10 %. Tuleks valida annusemäärade alanev järjestus, et näidata annusega seotud reaktsiooni ja täheldamata kahjuliku mõju taset (NOAEL). Kahe- või neljakordsed vahemikud on sageli optimaalsed alanevate annusemäärade kehtestamisel ja sageli on eelistatud neljanda katserühma lisamine väga suurte vahemike (nt üle kümnekordne tegur) annuste vahel. Toitumisuuringute puhul ei tohiks annuste vahemik olla mitte suurem kui kolmekordne. Annusemäärad tuleks valida varasemaid mürgisust käsitlevaid andmeid, eriti annuseid käsitlevate kordusuuringute tulemusi arvesse võttes. Mis tahes kättesaadavat teavet metabolismi ja katseühendi või sellega seotud ainete kineetika kohta tuleks samuti arvesse võtta. Selline teave aitab samuti viidata sellele, et annustamisrežiim on adekvaatne.

▼B

Kontrollrühmaks on rühm, kellega katseid ei tehta, või kandeainet saav kontrollrühm, kui kandeainet kasutatakse katseaine manustamisel. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neile ei anta uuritavat ainet. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet suuremas mahus. Kui katseainet manustatakse toidu kaudu ja seetõttu väheneb toidu võtmine või ärakasutamine, siis võib pidada vajalikuks paariskontrollrühma kasutamist. Teise võimalusena võib kasutada samaaegsete paariskontrollrühmade asemel andmeid, mis on saadud sellistest kontrollitud uuringutest, mis on välja töötatud selliste mõjude hindamiseks, mille on vähenenud toidutarbimine põhjustanud reproduktiivsetele parameetritele.

Arvesse võetakse kandeaine ja muude lisandite järgmiseid omadusi: katseaine absorbtsiooni, jaotamist, metabolismi või peetumist käsitlevad mõjud; katseaine keemilisi omadusi käsitlevad mõjud, mis võivad muuta toksilisi omadusi; ning toidu- või veetarbimist või toitumust käsitlevad mõjud.

1.4.4. **Piirsisalduskatse**

Kui suukaudne uuring ühe annusemääraga, mis on vähemalt 1 000 mg kg kehamassi kohta päevas või vastav protsendimäär toidus või joogivees, kui manustatakse toidu või joogivee kaudu, kasutades käesolevas uuringus kirjeldatud protseduure, ei tekita täheldatavaid toksilisi mõjusid vanematele või nende järglastele ja kui mürgisus eeldatavasti ei põhine struktuurselt ja/või metaboolselt sarnaste ühendite kohta käivatel andmetel, siis ei peeta vajalikuks täieliku uuringu tegemist, kus kasutatakse mitmeid annusemäärasid. Piirsisalduskatset kohaldatakse, välja arvatud siis, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat suukaudset annusemäära. Muude manustamisviiside korral, nagu näiteks sissehingamine või naha kaudu manustamine, võivad katseaine füüsikalis-keemilised omadused nagu lahustuvus tihti viidata suurimale kokkupuutetasemele ja seada sellele piiranguid.

1.4.5. **Annuste manustamine**

Loomadele annustatakse katseainet 7 päeva nädalas. Eelistatakse suukaudset manustamist (toit, joogivesi või sond). Kui kasutatakse muud manustamisviisi, tuleks seda põhjendada ning asjaomased muudatused võivad osutuda vajalikuks. Kõikidele loomadele annustatakse ainet sama meetodi järgi asjaomase katseperioodi jooksul. Kui katseainet manustatakse sondi abil, tehakse seda läbi söögitoru. Korraga manustatava vedeliku maht ei ületa 1 ml 100 g kehamassi kohta (0,4 ml 100 g kehamassi koha on maksimum maisiõli puhul), välja arvatud vesilahuste puhul, kui võib kasutada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Välja arvatud ärritavad või söövitavad ained, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks. Sundsöötmisega seotud uuringutes saavad pojad tavaliselt katseainet üksnes kaudselt piimast, vahetu annustamine algab nende jaoks võõrutuse ajal. Toidu või joogiveega seotud uuringutes saavad pojad täiendavalt katseainet vahetult, kui nad hakkavad ise sööma imetamisperioodi viimasel nädalal.

▼B

Toidu või joogivee kaudu manustatud ainete puhul on oluline tagada, et hõlmatud katseaine kogused ei häiriks tavapärast toitumist või veetasakaalu. Kui katseainet manustatakse toidus kas püsiva toidukontsentratsioonina (ppm) või võidakse kasutada püsivat annusemäära looma kehamassi suhtes, siis tuleb täpsustada kasutatud alternatiivi. Sondi kaudu manustatud aine puhul tuleks annus anda samal kellaajal iga päev ja kohandada vähemalt igal nädalal, et säilitada konstantset annusemäära looma kehamassi suhtes. Sondiannuse kohandamisel kaalu järgi tuleks arvesse võtta teavet katseaine platsenta kaudu levimise kohta.

1.4.6. **Katsete ajakava**

P-põlvkonna isas- ja emasloomade puhul algab igapäevane annustamine siis, kui nad on 5–9 nädalat vanad. F_1-isas- ja emasloomade puhul algab igapäevane annustamine võõrutamise ajal, tuleb meeles pidada, et katseaine toidu või joogivee kaudu manustamise korral võib toimuda F_1-põlvkonna poegade vahetu kokkupuude katseainega juba imetamise ajal. Mõlema soo puhul (P ja F_1) jätkatakse annustamist vähemalt 10 nädalat enne paaritamist. Annustamist jätkatakse mõlemast soost loomade puhul kahenädalase paaritumisperioodi jooksul. Isasloomad surmatakse humaanselt ja uuritakse neid siis, kui neid ei ole enam vaja reproduktiivsuse mõjude hindamiseks. P-põlvkonna emasloomade puhul jätkatakse annustamist kogu tiinuse aja ja kuni F_1-järglaste võõrutamiseni. Arvesse tuleks võtta muudatusi annustamise ajakavas, mis põhinevad katseaine, sh varasematel mürgisuse, metabolismi või bioakumulatsiooni tekke kohta käivatel kättesaadavatel andmetel. Iga looma annus peab tavaliselt põhinema looma kõige viimase individuaalse kehamassi kindlaksmääramisel. Annuse määramisel tuleks siiski olla ettevaatlik tiinuse viimasel trimestril.

P- ja F_1-põlvkonna isas- ja emasloomade käsitlemist jätkatakse kuni surmamiseni. Kõik P- ja F_1-põlvkonna täiskasvanud isas- ja emasloomad surmatakse humaanselt, kui neid enam ei vajada reproduktiivsuse mõjude hindamiseks. F_1-järglased, keda ei ole valitud paaritumiseks, ning kõik F_2-järglased surmatakse humaanselt pärast võõrutamist.

1.4.7. **Paaritumisprotseduur**

1.4.7.1. *P-põlvkonna paaritumine*

Iga paaritumise korral pannakse emasloom ühte puuri ühe sama annusemääraga isasloomaga (1:1 paaritumine) kuni suguühte toimumiseni või kaheks nädalaks. Iga päev uuritakse emasloomadel sperma või tupekorgi olemasolu. Tiinuse 0. päevaks peetakse päeva, mil leitakse tupekork või sperma. Kui paaritumine ei õnnestunud, saab kaaluda emaslooma uuesti paaritamist sama rühma viljakaks peetava isasloomaga. Paarituvad paarid tuleks selgesti andmetes ära näidata. Ödede-vendade paaritumist tuleks vältida.

▼B

1.4.7.2. *F_1-põlvkonna paaritumine*

F_1-järglaste paaritumise korral valitakse vähemalt üks isasloom ja üks emasloom võõrutamise ajal igast pesakonnast paaritumiseks muude sama annusemääraga, kuid erinevast pesakonnast poegadega, et sünniks F_2-põlvkond. Poegade valimine igast pesakonnast peaks olema juhuslik, kui poegade kehamassis või välimuses olulisi erinevusi ei ole täheldatud. Juhul kui on täheldatud nimetatud erinevusi, valitakse iga pesakonna parimad esindajad. Pragmaatiliselt on seda kõige parem teha kehamassi põhjal, kuid seda võib teha ka välimuse põhjal. F_1-järglasi ei paaritata enne, kuni nad on saanud täiesti suguküpseks.

Poegimata paare tuleks hinnata, et kindlaks määrata viljatuse näiv põhjus. See võib hõlmata selliseid protseduure nagu lisavõimalused paaritumiseks muude viljakaks peetavate isade või emadega, suguelundite mikroskoopiline uurimine ning innatsüklite või spermatogeneesi uurimine.

1.4.7.3. *Teine paaritumine*

Teatavatel juhtudel, nagu käsitlemisega seotud muutused pesakonna suuruses või ebaselge mõju täheldamine esimesel paaritumisel, on soovitav, et P- või F_1-sugupõlve täiskasvanud loomad paarituksid uuesti teise pesakonna saamiseks. On soovitav uuesti paaritada emas- ja isasloomi, kellel ei ole varem pesakonda olnud, viljakaks peetavate erinevast soost loomadega. Kui teise pesakonna saamist peetakse mõlemas põlvkonnas vajalikuks, tuleks loomad uuesti paaritada ligikaudu nädal pärast eelmise pesakonna võõrutamist.

1.4.7.4. *Pesakonna suurus*

Loomadel lubatakse poegida tavaliselt ja kasvatada järglased üles kuni võõrutamiseni. Pesakonna suuruse ühtlustamine ei ole kohustuslik. Kui seda on ühtlustatud, tuleks üksikasjalikult kirjeldada kasutatud meetodit.

1.5. VAATLUSED

1.5.1. **Kliinilised vaatlused**

Iga päev tuleks teha üldine kliiniline vaatlus ja sondi kaudu annustamise korral peaks selle ajastamisel arvesse võtma mõjude oodatavat kõrghetke pärast annustamist. Käitumise muutused, raske või pikaleveninud poegimise märgid ja kõik mürgisuse tunnused tuleks registreerida. Üksikasjalikum lisauuring iga looma kohta tuleks teostada vähemalt iga nädal ja kõige parem oleks seda teha siis, kui looma kaalutakse. Kõiki loomi tuleks jälgida haigestumise ja suremuse osas kaks korda päevas ja vajadusel nädalavahetusel kord päevas.

▼B

1.5.2. **Poeginud loomade kehamass ja toidu/vee tarbimine**

P- ja F_1-põlvkonna poeginud loomi kaalutakse annustamise esimesel päeval ja seejärel vähemalt kord nädalas. Poeginud emasloomi (P-ja F_1-põlvkond) kaalutakse vähemalt tiinuse 0-, 7., 14. ja 20. või 21. päeval ning imetamise ajal samadel päevadel poegade kaalumisel ja loomade surmamispäeval. Nimetatud vaatlustest tuleks teatada ükshaaval iga täiskasvanud looma kohta. Paaritumisele eelneval ajal ja tiinusperioodil mõõdetakse toidu tarbimist vähemalt iga nädal. Vee tarbimist mõõdetakse vähemalt iga nädal, kui katseainet manustatakse vees.

1.5.3. **Innatsükkel**

Innatsükli pikkuse ja normaalsust hinnatakse P- ja F_1-põlvkonna emasloomadel tupeäiete abil enne paaritumist ja valikuliselt paaritumise ajal, kuni leitakse tõendeid paaritumise toimumise kohta. Tupe-/emakakaelarakke võttes tuleks olla ettevaatlik, et vältida limaskesta kahjustamist ja seejärel pseudotiinuse teket (1).

1.5.4. **Spermaparameetrid**

Kõikide P- ja F_1-põlvkonna isasloomade surmamisel registreeritakse munandite ja munandimanuse mass ning üks kummastki elundist säilitatakse histopatoloogiliseks uurimiseks (vt punkte 1.5.7, 1.5.8.1). P- ja F_1-põlvkonna igast rühmast eraldatakse vähemalt kümne isasloома suurune osarühm, allesjäänud munanditest ja munandimanustest loendatakse homogeenimisele resistentsed spermatiidid ja munandimanuse sabas säilinud sperma hulk. Sama osarühma isasloomade puhul tuleks koguda munandimanuse sabas või seemnejuhas olev sperma liikuvuse ja sperma morfoloogia hindamiseks. Kui täheldatakse käsitlemisega seotud mõjusid või kui on tõendeid muude uuringute võimalike mõjude kohta spermatogeneesile, tuleks hinnata iga annusrühma kõikide isasloomade spermat; vastasel juhul võib loendamine piirduda kontrollrühma ning suure annusega rühma P- ja F_1-põlvkonna isasloomadega.

Homogeenimisele resistentsete munandites olevate spermatiidide ja munandimanuse sabas oleva sperma koguhulk tuleks arvutada (2, 3). Munandimanuse sabas säilinud seemnerakkude arv võib lähtuda kvalitatiivseteks hindamisteks kasutatud suspensioonis olevate seemnerakkude kontsentratsioonist ja mahust ning järelejäänud munandimanuse sabakoe jahvatamisel ja/või homogeenimisel saadud seemnerakkude arvust. Arvutamised tuleks teha kõikide valitud isasloomade osarühmade kõikides annuserühmades pärast loomade surmamist, välja arvatud juhul, kui tehakse video- või digitaalsalvestusi või kui proovid külmutatakse ja analüüsitakse hiljem. Sellistel juhtudel võib esmalt analüüsida kontrollrühma ja suure annusega rühma. Kui käsitlemisega ei kaasne mõjusid (nt mõjud seemnerakkude arvule, sperma liikuvusele ja morfoloogiale), ei ole vaja analüüsida muid annuserühmasid. Kui on täheldatud käsitlemisega kaasnevaid mõjusid, siis tuleks samuti hinnata väiksema annusega rühmasid.

▼B

Munandimanuse (või seemnejuha) sperma liikuvust tuleks hinnata või videosalvestada kohe pärast surmamist. Sperma tuleks koguda, minimiseerides kahju, ning lahjendada liikuvusanalüüsi jaoks vastuvõetavaid meetodeid kasutades (4). Progressiivselt liikuva sperma protsendimäär tuleks kindlaks määrata kas subjektiivselt või objektiivselt. Kui arvutipõhine liikuvusanalüüs sooritatakse (5, 6, 7, 8, 9, 10), sõltub progressiivne liikumine kasutaja määratud keskmise liikumiskiiruse ja otsesuse künnisest või lineaarsest indeksist. Kui proove filmitakse (11) või kujundid salvestatakse muul moel lahangu ajal, võib jätkuanalüüsi teha üksnes kontrollrühma ja suure annusega rühma P- ja F_1-põlvkonna isasloomadega, välja arvatud juhul, kui täheldatakse käsitlemisega kaasnevaid mõjusid; sellisel juhul tuleks samuti hinnata väikese annusega rühmasid. Video- või digitaalpildi puudumisel tuleks analüüsida kõikide katserühmade kõiki proove lahangu ajal.

Munandimanuse (või seemnejuhade) spermaproovi tuleks morfoloogiliselt hinnata. Spermat (vähemalt 200 seemnerakku proovi kohta) tuleks uurida fiksatiiviga käsitletud märgpreparaatidena (12) ja liigitada kas tavaliseks või ebatavaliseks. Morfoloogiliste sperma kõrvalekallete näidete hulka kuuluvad kokkusulamine, isoleeritud pead ning peade ja/või sabade ebamoodustised. Hinnata tuleks kõikidest annuserühmadest valitud isasloomade osarühma kas vahetult pärast loomade surmamist või video- ja digitaalsete salvestuste põhjal hiljem. Äigeid, mis on juba fikseeritud, võib uurida hiljem. Sellistel juhtudel võib esmalt analüüsida kontrollrühma ja suure annusega rühma. Kui käsitlemisega ei kaasne mõjusid (nt mõjud sperma morfoloogiale), ei ole vaja analüüsida muid annuserühmasid. Kui on täheldatud käsitlemisega kaasnevaid mõjusid, siis tuleks samuti hinnata väiksema annusega rühmasid.

Kui mõnda eespool nimetatud sperma hindamisparameetritest on juba uuritud süsteemse toksilisuse uuringu osana vähemalt 90 päeva, ei ole neid vaja tingimata korrata kahe põlvkonna uuringus. On siiski soovitav, et P-põlvkonna spermaproovid või digitaalsed salvestused säilitatakse hilisema hindamise tarbeks.

1.5.5. **Järglane**

Iga pesakonda uuritakse nii ruttu kui võimalik pärast poegimist (imetamise 0-päev), et kindlaks määrata poegade arv ja sugu, surnult sünnid, elussünnid ja kõikide anomaaliate olemasolu. 0-päeval surnult leitud poegi (kui nende laibad on leotamata) tuleks soovitavalt uurida võimalike defektide ja surmapõhjuse osas ning laibad tuleks säilitada. Elusad pojad tuleks kokku lugeda ja ükshaaval kaaluda sünni hetkel (imetamise 0-päev) või 1. päeval, ning seejärel regulaarsetel kaalumispäevadel, nt imetamise 4., 7., 14. ja 21. päeval. Füüsilised või käitumuslikud kõrvalekalded, mida on täheldatud emadel või järglastel, tuleks registreerida.

▼B

Järglase füüsiline areng tuleks registreerida peamiselt kehamassi lisandumise teel. Muud füüsilised parameetrid (nt kõrva ja silma avanemine, hammaste teke, karvakasv) võivad anda täiendavat teavet, kuid nimetatud andmeid peaks soovitavalt hindama seksuaalset küpsust käsitlevate andmete kontekstis (nt vanus ja kehamass tupe avanemisel või suguti ja eesnaha eraldumisel) (13). Soovitatakse F_1-põlvkonna järglaste funktsionaalseid uuringuid (nt motoorne tegevus, sensoorne funktsioon, reflekside ontogenees) enne ja/või pärast võõrutamist, eelkõige neid uuringuid, mis on seotud seksuaalse küpsusega, juhul kui selliseid uuringuid ei käsitleta eraldi katsetes. Tupe avanemise ja eesnaha eraldumise iga määratakse kindlaks paaritumiseks valitud F_1-põlvkonna võõrutatud poegade puhul. Anogenitaalset vahemaad mõõdetakse sünnijärgsel 0. päeval F_2-põlvkonna poegade puhul, kui F_1-põlvkonna sooline jagunemine või seksuaalse küpsuse saavutamise ajastus selleks põhjust annavad.

Funktsionaalsed vaatlused võib ära jätta rühmades, millel vastasel juhul ilmneksid negatiivsete mõjude selged tunnused (nt oluline massi vähenemine jne). Kui funktsionaalseid uuringuid tehakse, ei peaks neid tegema paaritumiseks valitud poegadega.

1.5.6. **Üldlahang**

Surmamise või uuringu käigus suremise korral uuritakse makroskoopiliselt kõiki poeginud loomi (P- ja F_1-põlvkond), kõiki väliste kõrvalekalletega või kliiniliste tunnustega poegi ja juhuslikult valitud F_1- ja F_2-põlvkonna mõlemast soost ja igast pesakonnast poegi mis tahes strukturaalsete kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Tuleks uurida humaanselt surmatud suremisseisundis poegade või surnud poegade (kui nende laibad on leotamata) võimalikke defekte ja/või surmapõhjust ning nende laibad tuleks säilitada.

Kõikide esimest korda poegivate emasloomade emakat tuleks uurida implantatsioonikohtade olemasolu ja arvu suhtes viisil, mis ei sisalda histopatoloogilist hindamist.

1.5.7. **Elundite massid**

Surmamise ajal määratakse kindlaks kõikide P- ja F_1-põlvkonna poeginud loomade kehamass ja järgmiste elundite mass (paariselundid peaks kaaluma ükshaaval):

— emakas, munasarjad;

— munandid, munandimanused (kogumass ja sabaosa mass);

— eesnääre;

— seemnepõiekesed koos näärmete ja nendes olevate vedelikega ning eesnäärmega (tervikuna);

— aju, maks, neerud, põrn, ajuripats, kilpnäärmed ja neerupealised ning määratud sihtelundid.

Lahanguks valitud F_1 – ja F_2-põlvkonna poegade kehamassid tuleks määrata kindlaks surmamisel. Kaalutakse järgmiseid elundeid, mis on juhuslikult valitud ühest pojast/soost/pesakonnast (vt punkt 1.5.6): aju, põrn ja harknääre.

▼B

Üldlahangu ja elundite kaalumise tulemusi tuleks hinnata muudes, korduvate annustega uuringutes tehtud vaatluste kontekstis, kui see on teostatav.

1.5.8. **Histopatoloogia**

1.5.8.1. *Poeginud loomad*

P- ja F_1-põlvkonna poeginud loomadelt eemaldatakse järgmised elundid ja koed või nende representatiivsed proovid ja neid säilitatakse sobivas kasvukeskkonnas histopatoloogilise uuringu tarbeks:

— tupp, emakas koos emakakaelaga ning munasarjad (säilitatakse sobivas kinnitis);

— üks munand (säilitatakse Bouini või võrreldavas kinnitis), üks munandimanus, seemnepõiekesed, eesnääre ja selle eesosa;

— eelnevalt identifitseeritud sihtelund(id) kõikidelt paaritumiseks valitud P- ja F_1-põlvkonna loomadelt.

Eespool loetletud säilitatud elundite ja kudede täielik histopatoloogiline uuring tehakse kõikide paaritumiseks valitud ning suure annusega ja kontrollrühma kuuluvate P-ja F_1-põlvkonna loomade kohta. P-põlvkonna loomade munasarjade uurimine ei ole kohustuslik. Käsitlemisega seotud muutustega elundeid tuleks samuti uurida väikese ja keskmise annusega rühmades, et aidata NOAELi välja selgitada. Lisaks sellele tuleks selliste väikese ja keskmise annusega loomade, kellel kahtlustatakse vähenenud viljakust, nt need, kellel ei õnnestunud paarituda, viljastuda, sigitada või sünnitada terveid järglasi, või need, kelle innatsüklit või sperma hulka, liikuvust või morfoloogiat mõjutati, suguelundeid hinnata histopatoloogiliselt. Kõiki üldkahjustusi, nagu atroofia või kasvajad, tuleks uurida.

Munandeid tuleks üksikasjalikult histopatoloogiliselt uurida (nt kasutades Bouini kinnitit, parafiinilõike või 4–5 μm paksuseid läbilõikeid), et kindlaks teha käsitlemisega seotud mõjud nagu paigale jäänud spermatiidid, puuduvad sugurakukihid või -liigid, hulktuumsed hiidrakud või spermatogeensete rakkude irdumine luumenisse (14). Puutumatu munandimanuse puhul tuleb uurida pead, keha ja saba, mida saab teha pikilõigete hindamise teel. Munandimanuse puhul tuleks hinnata leukotsüüdi infiltratsiooni, rakutüüpide esinemissageduse muutusi, hälbivaid rakutüüpe ja sperma fagotsütoosi. PAS- ja hematoksüliiniga värvimist võib kasutada isasloomade suguelundite uurimisel.

Imetamisjärgne munasari peaks sisaldama alg- ja kasvavaid munarakke ning imetamisaegseid suuri kollakehasid. Histopatoloogiline uurimine peaks tuvastama algmunarakkude populatsiooni kvalitatiivse vähenemise. Algmunarakkude kvantitatiivne hindamine tuleks teha F_1-põlvkonna emasloomadele; loomade arv, munasarjalõigete valik ja lõikeproovi suurus peaksid statistiliselt sobima kasutatava hindamisprotseduuriga. Uurimisel peaks arvutama algmunarakkude arvu, mida saab kombineerida väikeste kasvavate munarakkudega, katse- ja kontrollrühma kuuluvate munasarjade võrdlemiseks (15, 16, 17, 18, 19).

▼B

1.5.8.2. *Võõrutatud pojad*

Kõikide väliste kõrvalekalletega või kliiniliste tunnustega poegade, samuti paaritumiseks mittevalitud F_1- ja F_2-põlvkonnast juhuslikult valitud ühe poja/soo/pesakonna selgete kõrvalekalletega kude ja sihtelundid fikseeritakse ja säilitatakse sobivas kasvukeskkonnas histopatoloogilise uurimise tarbeks. Säilitatud kudedele tehakse täielik histopatoloogiline määramine, milles pearõhk on reproduktiivsüsteemi elunditel.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Andmed edastatakse kokkuvõtlikult iga emaslooma ja nende järglase kohta tabeli kujul, näidates iga katserühma ja põlvkonna kohta loomade arvu katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel surmatud loomade arvu, surma ja humaanse surmamise ajad, viljakate emasloomade arvu, tiinete emasloomade arvu, mürgistusnähtudega loomade aru, mürgistusnähtude kirjelduse, sh toksiliste mõjude algusaja, kestuse ja raskuse, embrüot/-loodet käsitlevate vaatluste liigid ja kogu asjaomane teave pesakonna kohta.

Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata sobiva, üldiselt heakskiidetud statistilise meetodi abil; statistilised meetodid tuleks valida uurimuse kavandamisel ja neid tuleks põhjendada. Annuse ja sellele reageerimise statistilised mudelid võivad olla andmete analüüsimisel vajalikud. Protokoll peaks hõlmama piisavalt teavet analüüsimeetodi kohta ja kasutatava arvutiprogrammi kohta, nii et sõltumatu arvestaja/statistik võib uuesti hinnata ja rekonstrueerida analüüsi.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE

Kahe põlvkonna reproduktsiooni toksilisuse uuringu avastusi tuleks hinnata täheldatud mõjude, kaasa arvatud lahangu- ja mikroskoopilised leiud, suhtes. Hindamine hõlmab katseaine annuse ja kõrvalekallete – sh üldkahjustused, identifitseeritud sihtelundid, mõjutatud viljakus, kliinilised kõrvalekalded, mõjutatud paljunemisvõime ja pesakonna suurus/laad, kehamassi muutused, mõjud suremusele ja mis tahes muud toksilised mõjud – olemasolu või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahelist seost või selle puudumist. Katseaine füüsikalis-keemilisi omadusi ja vajaduse korral toksikokineetilisi andmeid tuleks võtta arvesse katsetulemuste hindamisel.

Nõuetekohaselt tehtud reproduktsiooni toksilisuse uuring hindab rahuldavalt mõjuta määrasid ja mõistab reproduktsioonile, poegimisele, imetamisele, sünnijärgsele arengule, kaasa arvatud kasv ja seksuaalne areng, kahjulikke mõjusid.

▼B

2.3. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kahe põlvkonna reproduktsiooni toksilisuse uuring annab teavet korduvate ainega kokkupuudete mõjude kohta reproduktiivtsükli kõikidel etappidel. Eelkõige annab uuring teavet reproduktiivparameetrite kohta ning järglaste arengu, kasvu, suguküpseks saamise ja ellujäämise kohta. Uuringu tulemusi tõlgendatakse koostoimes subkroonilisel, sünnieelse arengu ja toksikokineetilisel ning muudel uuringutel tehtud avastustega. Käesoleva uuringu tulemusi võib kasutada kemikaali täiendava uurimise vajaduse hindamisel. Uuringu tulemuste ekstrapoleerimine on kehtiv piiratud ulatuses. Neid saab kõige paremini kasutada teabe andmiseks mõjuta määrade ja inimeste lubatud kokkupuudete kohta (20, 21, 22, 23).

3. **PROTOKOLL**

3.1. KATSEPROTOKOLL

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

— füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— tunnusandmed;

— puhtus.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valiku põhjendus, kui see on veest erinev.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, toitumine, pesamaterjalid jne;

— iga looma kaal katse alguses.

Katsetingimused:

— annuste valiku põhjendus;

— katseaine valmistise/toidupreparaadi üksikasjad, saadud kontsentratsioonid;

— preparaadi stabiilsus ja homogeensus;

— katseaine manustamise üksikasjad;

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg kg kehamassi kohta päevas), vajaduse korral;

— üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta.

▼B

Tulemused:

— toidu tarbimine ja vajaduse korral vee tarbimine, toidu tõhusus (kehamassi lisandumine tarbitud toidu grammi kohta) ning katseaine tarbimine P- ja F_1-põlvkonna loomadel, välja arvatud perioodil, mil loomi hoitakse koos, ja vähemalt imetamise viimasel kolmandikul;

— andmed absorbtsiooni kohta (kui seda on mõõdetud);

— paaritumiseks valitud P- ja F_1-põlvkonna loomade kehamassi andmed;

— pesakonna ja poegade massi andmed;

— andmed poeginud loomade kehamassi kohta surmamisel ning elundite täieliku ja suhtelise massi kohta;

— kliiniliste vaatluste laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas kahjud on pöörduvad või mitte);

— surmaaeg katse ajal või andmed loomade ellujäämise kohta kuni surmamiseni;

— andmed toksilise reaktsiooni kohta sooti ja annuste kaupa, kaasa arvatud paaritumis-, viljakus-, tiinus-, sünni-, elujõulisus- ja imetamisindeksid; protokoll peaks viitama nende indeksite arvutamisel kasutatud arvudele;

— toksilised või muud mõjud reproduktsioonile, järglastele, sünnijärgsele kasvule jne;

— lahangu leiud;

— kõikide histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— tavalise innatsükliga P- ja F_1-põlvkonna emasloomade arv ning tsükli pikkus;

— munandimanuse sabaosas oleva sperma koguarv, progressiivselt liikuva sperma protsendimäär, morfoloogiliselt normaalse sperma protsendimäär ning tuvastatud kõrvalekaldega sperma protsendimäär;

— aega paaritumiseni, sh päevade arv paaritumiseni;

— tiinuse pikkus;

— implantatsioonide arv, kollakehad, pesakonna suurus;

— elussündide arv ja implantatsioonide järel toimunud abordid;

— selgelt nähtavate arenguhälvetega poegade arv, kui see on kindlaks määratud, tuleks teatada kängujäänud loomade arv;

— andmed poegade füüsilise arengu järkude kohta ja andmed muude sünnijärgsete arengute kohta; hinnatud füüsilise arengu järke tuleks põhjendada;

— andmed poegade ja täiskasvanud loomade funktsionaalsete vaatluste kohta;

— vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

▼B

Tulemuste arutelu.

Järeldused, sh NOAEL-väärtused mõjude kohta emadele ja järglastele.

4. **VIITED**

1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied* Toxicology 12:92-108.

3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reprodudive* Toxicology 5:39-44.

5) Seed, J. et al. (19 9 6). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive* Toxicology 10(3):237-244.

6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reprodudive* Toxicology 6:267-273.

7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *journal of Andrology* 13:409-421.

8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive* Toxicology 5:449-458.

9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in* Toxicology, Part A., Academic, Orlando, Florida, pp. 319-333.

10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

11) Working, P.K. and M. Hurtt (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and CA. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

20) Thomas, J. A. (19 91). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and CD. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

23) (23) Palmer, A.K. (19 78). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOKSIKOKINEETIKA**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 417 (2010). Uuritava kemikaali toksikokineetika uuringud tehakse selleks, et saada tõest teavet kemikaali imendumise, jaotumise, biotransformatsiooni (metaboliseerimise) ja väljutamise kohta, et aidata kaasa kontsentratsiooni või doosi seostamisele täheldatud mürgisusega ning aidata mõista selle mürgisuse mehhanismi. Toksikokineetika võib aidata mõista toksikoloogiauuringuid, kuna sel viisil näidatakse, et katseloomad puutuvad uuritava kemikaaliga kokku süsteemselt, ning selgitatakse välja, millised struktuuriühikud (lähtekemikaal/metaboliidid) ringlevad katselooma organismis. Kõnealustest uuringutest saadavad toksikokineetika põhiparameetrid annavad teavet ka uuritava kemikaali võimaliku akumulatsiooni kohta kudedesse ja/või organitesse ning uuritava kemikaaliga kokkupuute tõttu võimaliku biotransformatsiooni põhjustamise kohta.

2. Toksikokineetika andmed võivad aidata hinnata, kuivõrd adekvaatne ja asjakohane on ekstrapoleerida loomadel avalduva mürgisuse andmeid inimestega seotud ohtude ja/või riskide hindamisele. Lisaks sellele võivad toksikokineetilised uuringud anda kasulikku teavet mürgisuse uuringute doositasemete (lineaarne *vs*. mittelineaarne kineetika), manustamistee mõju ja biokättesaadavuse kindlakstegemiseks ning uuringu kavandamise küsimuste lahendamiseks. Teatavat tüüpi toksikokineetika andmeid on võimalik kasutada füsioloogial põhineva toksikokineetika (PBTK) mudeli arendamiseks.

3. Metaboliitide/toksikokineetika andmetel on tähtsaid kasutusvaldkondi, näiteks aitavad need ennustada kemikaalide võimalikku mürgisust ja toimeviisi ning mõista mürgisuse ja toimeviisi seoseid doositaseme ja kokkupuutumisteega. Lisaks sellele võib kemikaalide metaboliseerumise andmetest saada teavet, mis aitab hinnata uuritava kemikaali eksogeenselt tekkinud/-valmistatud metaboliitidega kokkupuute toksikoloogilist tähtsust.

4. Head toksiko-kineetilised andmed aitavad teha järeldusi, kuivõrd usaldusväärsed ja kasutatavad on kemikaalide ohutuse hindamisel kvantitatiivsed struktuuri-aktiivsuse sõltuvused, analoogmeetod ja grupeerimismeetod. Kineetika andmeid võib kasutada ka muude uuringute (näiteks *in vivo* / *in vitro*) toksikoloogilise asjakohasuse hindamiseks.

5. Kui ei ole nimetatud muud manustamisteed (vt eelkõige punktid 74–78), kasutatakse käesolevat katsemeetodit uuritava kemikaali suukaudse manustamise puhul.

LÄHTEKAALUTLUSED

6. Õigussüsteemides on eri kemikaaliklasside (näiteks pestitsiidid, biotsiidid, tööstuskemikaalid) toksikokineetika näitajate ja parameetrite mõõtmisega seoses sätestatud erinevad nõuded ja vajadused. Erinevalt enamikust katsemeetoditest kirjeldatakse käesolevas katsemeetodis toksikokineetika katseid, mis hõlmavad mitmeid mõõtmisi ja näitajaid. Tulevikus töötatakse arvatavasti välja mitu uut katsemeetodit ja/või juhenddokumenti, et kirjeldada eraldi ja täpsemalt iga näitajat. Käesoleva katsemeetodi puhul määratakse tehtavad katsed või hindamised kindlaks iga õigussüsteemi nõuete ja/või vajadustega.

▼M4

7. Regulatiivseks otstarbeks võib uuritava kemikaali toksiko-kineetilist käitumist hinnata paljude uuringutega. Kõik kõnealused võimalikud uuringud ei pruugi uuritava kemikaali hindamiseks olla siiski vajalikud, kõik oleneb konkreetsetest regulatiivsetest vajadustest või olukorrast. Toksiko-kineetiliste uuringute kavandamiseks on vaja paindlikkust ja uuritava kemikaali omaduste arvestamist. Mõnikord tuleb uurida ainult teatavaid küsimusi, et teha kindlaks uuritava kemikaaliga seotud ohud ja riskid. Mõnikord võib toksiko-kineetilisi andmeid koguda muus toksikoloogiauuringus kemikaali hindamise osana. Muus olukorras võivad olla vajalikud ulatuslikud täiendavad toksiko-kineetilised uuringud, kui selleks on regulatiivne vajadus või tekib uuritava kemikaali hindamisel uusi küsimusi.

8. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali ja asjakohaste metaboliitide ning analoogide kohta, et parandada uuringu kvaliteeti ja vältida loomade tarbetut kasutamist. See võib hõlmata muude asjakohaste katsemeetodite andmete kasutamist (*in vivo* uuringud, *in vitro* uuringud ja/või *in silico* hindamised). Füüsikalis-keemilised omadused, näiteks kemikaali jaotustegur süsteemis oktanool-vesi (log P_{OW}), pKa, lahustuvus vees, aururõhk ja molekulmass võivad olla kasulikud uuringu planeerimisel ning tulemuste tõlgendamisel. Need on võimalik kindlaks määrata sobivate meetodite abil, nagu on kirjeldatud asjakohastes katsemeetodites.

PIIRANGUD

9. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud tegelemiseks eriolukordadega (näiteks tiined või poegi imetavad loomad ja noorloomad) või võimalike jääkide hindamiseks kemikaalidega kokku puutunud loomades, keda inimene tarbib toiduks. Katsemeetodi B.36 kohase uuringu andmed võivad siiski anda taustteavet, mis aitab kavandada eriuuringuid selliste küsimuste lahendamiseks. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud nanomaterjalide katsetamiseks. OECD katsejuhendite esialgse läbivaatamise aruandes, milles käsitletakse nende kohaldatavust nanomaterjalide uurimisele, on märgitud, et katsejuhend nr 417 (mis on samaväärne käesoleva katsemeetodiga B.36) ei pruugi olla kohaldatav nanomaterjalide uurimisele (1).

MÕISTED

10. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on esitatud liites.

LOOMADE HEAOLU KAALUTLUSED

11. Suunised loomade humaanse kohtlemise kohta on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19 (2). OECD juhenddokumenti nr 19 soovitatakse kasutada kõigi käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* ja *in vitro* uuringute puhul.

MEETODITE KIRJELDUS

Prooviuuringud

12. Soovitatakse kasutada prooviuuringuid, et valida toksiko-kineetilistel uuringutel jälgitavad parameetrid (näiteks kemikaali metaboliseerimine, massibilanss, analüüside tegemine, dooside valimine, CO_2 väljahingamine jne). Mõnda kõnealustest parameetritest saab määrata ka ilma radiomärgistatud kemikaali kasutamata.

▼M4

Loomade valimine

Liik

13. Toksikokineetika katsetes kasutatav loomaliik (ja liin) peaks eelistatavalt olema sama kui asjakohase uuritava kemikaaliga tehtud muudes toksikoloogilistes uuringutes. Üldiselt tuleks kasutada rotti, kuna seda liiki on toksikoloogilistes uuringutes palju kasutatud. Muu või täiendava liigi kasutamine võib olla põhjendatud, kui asjakohased toksikoloogilised uuringud näitavad märkimisväärset mürgisust kõnealuse liigi suhtes või kui mürgisus kõnealuse liigi suhtes või liigi isenditel avalduv toksikokineetika on näidatud olevat inimeste jaoks asjakohasem. Loomaliigi ja liini valikut tuleks põhjendada.

14. Kui ei ole öeldud teisiti, viidatakse käesolevas katsemeetodis katseliigina rotile. Muu katseliigi kasutamise korral võib meetodi teatavaid aspekte muuta.

Vanus ja liin

15. Tuleks kasutada noori terveid täiskasvanud loomi, kes on annustamise ajal tavaliselt 6–12 nädala vanused (vt ka punktid 13 ja 14). Muude kui noorte täiskasvanud loomade kasutamise korral tuleks seda põhjendada. Kõik loomad peaksid uuringu alguses olema sarnases vanuses. Üksiku looma kehamass ei tohiks erineda rohkem kui ±20% katserühma keskmisest kehamassist. Kõige parem oleks kasutada sama liini, mida kasutati uuritava kemikaali toksikoloogilise andmebaasi koostamisel.

Loomade arv ja sugu

16. Iga uuritava doosi korral tuleks kasutada vähemalt nelja samast soost looma. Kasutatud loomade soo valikut tuleks põhjendada. Kui on tõendeid, et kummagi soo puhul avaldub mürgisus erinevalt, tuleks kaaluda mõlema soo kasutamist (neli isas- ja neli emaslooma).

Pidamis- ja söötmistingimused

17. Loomi tuleks katse ajal üldjuhul eraldi pidada. Eriolukorras võib olla põhjendatud rühmas pidamine. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 °C (±3 °C) ja suhteline õhuniiskus 30–70 %. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Uuritav kemikaal

18. Uuringu kõigi massibilansi ja metaboliitide tuvastamise andmete saamiseks tuleks kasutada ^{14}C abil radiomärgistatud uuritavat kemikaali. Kui on aga võimalik tõendada, et

— massibilanssi ja metaboliite on võimalik õigesti hinnata märgistamata uuritava kemikaaliga,

— mitteradioaktiivse uuritava kemikaaliga kasutatud meetodi analüütiline täpsus ja tundlikkus on radiomärgistatud uuritava kemikaali kasutamisega võrreldes samaväärne või suurem,

▼M4

ei ole radiomärgistatud uuritavat kemikaali vaja kasutada. Samuti võib kasutada muid radioaktiivseid ja stabiilseid isotoope, eelkõige juhul, kui kõnealune element põhjustab uuritava kemikaali mürgisuse või on selle osa. Kui võimalik, peaks radiomärgis asuma molekuli metaboliseerimise suhtes stabiilses põhiosas (osa, mis ei ole vahetatav, mida ei eemaldata metaboliseerimisel CO_2-na ja mis organismis ei lähe ühe süsinikuaatomiga ühendite puuli). Uuritava kemikaali metaboliseerimise käigu väljaselgitamiseks võib olla vajalik märgistada molekulis mitu aatomit või konkreetset piirkonda.

19. Radiomärgisega ja radiomärgiseta uuritavat kemikaali tuleks asjakohaste meetodite abil analüüsida, et veenduda kemikaali puhtuses ja vastavuses keemilisele määratlusele. Radioaktiivse uuritava kemikaali radioloogiline puhtus peaks olema nii suur, kui konkreetse uuritava kemikaali puhul on võimalik saavutada (ideaaljuhul üle 95 %), ning tuleks teha mõistlikud jõupingutused, et tuvastada kõik lisandid, mida on 2 % või rohkem. Tuleb esitada andmed uuritava kemikaali puhtuse kohta ja kõikide kindlakstehtud lisandite keemilise määratluse ja osakaalu kohta. Igas regulatiivses kavas võidakse otsustada anda täiendavaid suuniseid, kuidas määratleda ja kirjeldada uuritavat kemikaali, mis kujutab endast segu, ning milliseid meetodeid tuleb kasutada selle puhtuse määramiseks.

Doosi valik

Prooviuuring

20. Üldjuhul on prooviuuringuks piisav üks suukaudne doos. Doos ei tohiks olla mürgine, kuid peaks olema piisavalt suur, et võimaldada metaboliitide tuvastamist väljaheidetes ja väljahingatud õhus (ja plasmas, kui see on asjakohane) ning saavutada prooviuuringu nimetatud eesmärk, mis on märgitud käesoleva katsemeetodi punktis 12.

Põhiuuring

21. Põhiuuringu puhul eelistatakse vähemalt kahe doosi kasutamist, kuna vähemalt kahest doosirühmast kogutud teave võib aidata määrata doosi muudes mürgisuse uuringutes ja hinnata juba olemasolevate mürgisuse katsete mõju sõltuvust doosist.

22. Kui manustatakse kahte doosi, peaksid mõlemad doosid olema piisavalt suured selleks, et võimaldada metaboliitide tuvastamist väljaheidetes (ja plasmas, kui see on asjakohane). Doosi valimisel tuleks arvesse võtta olemasolevatest toksilisuse andmetest saadud teavet. Kui teavet (näiteks ägeda suukaudse mürgisuse või korduvdoosi mürgisuse uuringute teavet kliiniliste mürgistusnähtude kohta) ei ole, võib kaaluda suuremat annust, mis on allpool LD_{50} (suukaudsel ja nahakaudsel manustamisel) või LC_{50} (sissehingamise kaudu manustamisel) hinnangulist väärtust või allpool ägeda mürgisuse hinnangulise vahemiku alumist väärtust. Väiksem annus peaks olema suurema doosi mingi murdosa.

23. Ainult ühe doositaseme uurimise korral peaks doos ideaaljuhul olema piisavalt suur, et võimaldada metaboliitide tuvastamist väljaheidetes (ja plasmas, kui see on asjakohane), põhjustamata ilmset mürgistust. Teise doositaseme lisamata jätmist tuleks põhjendada.

24. Kui on vaja määrata doosi mõju kineetilistele protsessidele, ei pruugi kahest doosist piisata ja vähemalt üks neist peaks olema piisavalt suur, et saavutada kõnealuses protsessis küllastumist. Kui plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC) ei ole põhiuuringus kasutatud kahe doositaseme vahel lineaarne, on see oluline tõend, et ühe või enama kineetilise protsessi küllastumine toimub kusagil kahe doositaseme vahel.

▼M4

25. Vähese mürgisusega uuritavate kemikaalide puhul tuleks (suu- ja nahakaudse manustamise korral) kasutada maksimumdoosi 1 000 mg kehakaalu kg kohta (sissehingamise teel manustamise puhul vt suunised, käesoleva lisa peatükk B.2; üldjuhul ei ületa see doos 2 mg/l). Kemikaalist olenevalt võib regulatiivsete nõuete täitmiseks osutuda vajalikuks suurema doosi kasutamine. Doosi valik peaks olema alati põhjendatud.

26. Ühe doosi toksiko-kineetilised ja kudedes jaotumise andmed võivad olla piisavad bioakumuleerumise ja/või püsivuse võimalikkuse kindlaksmääramiseks. Mõnel juhul võib siiski olla vajalik korduvdoosi manustamine, i) et käsitleda täpsemalt bioakumuleerumise ja/või püsivuse võimalikkust või muutusi toksikokineetikas (s.o näiteks ensüümide induktsioon ja inhibeerimine), või ii) kui seda nõuab kohaldatav õigussüsteem. Kuigi üldjuhul piisab väikese doosi korduvast manustamisest, võib korduvdoosiuuringute puhul olla mõnedel tingimustel vajalik ka suure doosi korduv manustamine (vt punkt 57).

Uuritava kemikaali manustamine

27. Uuritav kemikaal tuleks lahustada või tekitada selle ühtlane suspensioon samas kandeaines, mida on kasutatud muude suukaudse mürgisuse sundsöötmisega manustamisega uuringutes, kui kõnealune teave kandeaine kohta on olemas. Kandeaine valikut tuleks põhjendada. Kandeaine ja doseerimiskoguse valimist tuleks käsitleda juba uuringu koostamisel. Tavaline manustamismeetod on sundsöötmisega; manustamine želatiinkapslis või söödasegu osana võib siiski olla konkreetses olukorras kasulikum (mõlemal juhul tuleks valitud meetodit põhjendada). Igale loomale tegelikult manustatud doosi tuleks kontrollida.

28. Suukaudsel sundsöötmisel korraga manustatava vedeliku maksimaalne kogus oleneb katselooma suurusest, doosi kandeaine tüübist ja sellest, kas loomi enne uuritava kemikaali manustamist näljutatakse või mitte. Enne manustamist sööda andmist või mitteandmist tuleks põhjendada. Üldiselt peaks manustatav maht nii veepõhiste kui ka muude kandeainete puhul olema nii väike, kui praktiliselt võimalik. Doosi kogus näriliste puhul ei tohiks üldiselt ületada 10 ml kehakaalu kg kohta. Lipofiilsema uuritava kemikaali puhul kasutatav kandeaine kogus võiks alata 4 ml-st kehakaalu kg kohta. Korduvdoosiuuringutes, kus igapäevane näljutamine on vastunäidustatud, tuleks kaaluda väiksema doosikoguse (näiteks 2–4 ml kehakaalu kg kohta) kasutamist. Kui võimalik, tuleks püüda kasutada sellist doosikogust, mis on kooskõlas uuritava kemikaaliga tehtud muude suukaudse sundsöötmise uuringutega.

29. Uuritava kemikaali intravenoosset manustamist ning uuritava kemikaali mõõtmist veres ja/või väljaheidetes võib kasutada biosaadavuse või suhtelise suukaudse imendumise määramiseks. Intravenoosse manustamise uuringu puhul manustatakse asjakohase kandeaine abil üks doos uuritavat kemikaali (mis on üldiselt võrdväärne väikese suukaudse doosiga, aga ei tohi seda ületada, vt doosi valimine). Seda materjali tuleks manustada sobiv kogus (näiteks 1 ml kehakaalu kg kohta) valitud manustamiskohas vähemalt neljale asjakohasest soost loomale (kui see on põhjendatud, siis võib kasutada mõlemat sugu, vt punkt 16). Intravenoosseks manustamiseks tuleb ette valmistada uuritava kemikaali täielikult lahustatud või suspendeeritud doos. Intravenoosse manustamise kandeaine ei tohiks mõjutada vere koostist ega

▼M4

voolamist. Kui uuritav kemikaal kanti üle infusioonipumbaga, tuleks katseprotokollis teatada ülekandmise kiirus, mis peaks kõigi loomade puhul olema standardne. Kanüüli viimisel jugulaarveeni (uuritava kemikaali manustamiseks ja/või vere kogumiseks) või reiearterisse (uuritava kemikaali manustamiseks) tuleks kasutada tuimestust. Tuimestuse tüüpi tuleks hoolega kaaluda, kuna see võib toksikokineetikat mõjutada. Loomad peaksid saama enne uuritava kemikaali ja kandeaine manustamist piisavalt toibuda.

30. Teatava uuritava kemikaali puhul võib olla asjakohane muu manustamistee, näiteks nahakaudne või sissehingamise teel manustamine (vt punktid 74–78), olenevalt kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest ja eeldatavast kasutamisest inimeste poolt või inimestega kokkupuute teest.

Mõõtmised

Massibilanss

31. Massibilansi määramiseks liidetakse manustatud (radioaktiivse) doosi kogused (protsent esialgsest doosist), mis leitakse uriinis, väljaheites ja väljahingatud õhus ning tehakse kindlaks kudedes, korjusejääkides ja puuripesuvedelikus (vt punkt 46). Üldiselt peetakse piisavaks, kui manustatud uuritavast kemikaalist (radioaktiivsusest) suudetakse liitmisega koguda > 90 %.

Imendumine

32. Esialgne imendumise hinnang saadakse sel teel, et massibilansi arvutusest lahutatakse seedetraktis ja/või väljaheites oleva doosi osakaal. Imendumise protsendi arvutus on esitatud punktis 33. Väljahingatava õhu, väljaheite ja uriini uurimise kohta vt punktid 44–49. Kui pärast suukaudset manustamist ei ole imendumise täpset ulatust võimalik massibilansi abil kindlaks määrata (näiteks kui üle 20 % manustatud doosist leitakse väljaheitest), võib vajalik olla täpsem uuring. Kõnealune uuring võib seisneda kas 1) uuritava kemikaali suukaudses manustamises ja määramises, kui palju uuritavat kemikaali leidub sapis, või 2) uuritava kemikaali suukaudses ja intravenoosses manustamises ning uriinis leiduva uuritava kemikaali netosisalduse mõõtmises, millele liidetakse väljahingatud õhus ja korjuses leiduv uuritava kemikaali sisaldus kummagi manustamistee puhul. Mõlemas uuringuprojektis mõõdetakse radioaktiivsust uuritava kemikaali ja metaboliitide keemilise analüüsi asendusmeetodina.

33. Sapi kaudu eritamise uuringu tegemisel kasutatakse üldiselt suukaudset manustamist. Kõnealuses uuringus viiakse vähemalt nelja asjakohasest soost (vajaduse korral kummastki soost) looma sapijuhasse kanüül ja manustatakse üks doos uuritavat kemikaali. Pärast uuritava kemikaali manustamist tuleks jälgida radioaktiivsuse / uuritava kemikaali eritumist sapiga nii kaua, kui on vaja sapi kaudu erituva manustatud doosi protsendi hindamiseks, mida saab otseselt kasutada suukaudse imendumise ulatuse arvutamiseks järgmiselt:

$$\text{imendumise protsent} = \begin{array}{l}(\text{kogus sapis} + \text{uriinis} + \text{väljahingatud õhus} \\ + \text{korjuses ilma seedetrakti sisalduseta})/ \\ \text{manustatud kogus} \times 100\end{array}$$

34. Mõne uuritavate kemikaalide klassi puhul võib imendunud doos sekreteeruda otse läbi soolestiku membraanide. Sellisel juhul loetakse, et sapijuhasse sisestatud kanüüliga rotile suukaudselt manustatud doosi väljaheites sisalduva protsendi mõõtmine ei näita imendumata doosi protsenti. Kui oletatakse sekretsiooni otse soolestikku, soovitatakse imendunud doosi protsendi arvutamisel toetuda imendumisele, mis arvutatakse suukaudse manustamise puhul väljutamise ja intravenoosse manustamise puhul väljutamise (intaktne rott või rott, kelle sapijuhasse on viidud kanüül) võrdluse alusel (vt punkt 35). Samuti soovitatakse, et kui peetakse vajalikuks soolestiku sekretsiooni arvulist määramist, tuleks mõõta doosi väljutamist pärast doosi intravenoosset manustamist rotile, kelle sapijuhasse on viidud kanüül.

▼M4

Biosaadavus

35. Biosaadavust on võimalik kindlaks määrata suukaudse ja intravenoosse manustamise rühmade plasma/vere kineetika alusel, nagu on kirjeldatud punktides 50–52, tuginedes uuritava kemikaali ja/või asjakohase metaboliidi (asjakohaste metaboliitide) keemilisele määramisele; sel juhul ei ole vaja kasutada radiomärgistatud uuritavat kemikaali. Uuritava kemikaali või asjakohase metaboliidi (asjakohaste metaboliitide) biosaadavuse (F) võib siis arvutada järgmiselt:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

kus AUC on plasmas sisalduva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala, IV on intravenoosne ja exp on eksperimentaalne manustamistee (suukaudne, nahakaudne või sissehingamise teel).

36. Süsteemsete mõjude riski hindamisel eelistatakse üldjuhul kasutada toksilise osa biosaadavust imendumise protsendi asemel, kui võrreldakse loomade uuringute süsteemseid kontsentratsioone analoogsete bioseire andmetega, mis saadakse töötajate kokkupuute uuringutest. Olukord võib olla keerukam, kui doosid on mittelineaarses vahemikus, seepärast on tähtis, et toksiko-kineetilise sõelumise raames määratakse kindlaks lineaarse vahemiku doosid.

Jaotumine kudedes

37. Teadmised uuritava kemikaali ja/või selle metaboliitide kudedes jaotumise kohta on olulised sihtkudede määramiseks ning mürgisuse aluseks olevate mehhanismide mõistmiseks, samuti teabe saamiseks uuritava kemikaali ja metaboliitide bioakumulatsiooni ja püsivuse võimalikkuse kohta. Summaarse (radioaktiivse) doosi protsenti kudedes ning samuti korjusejääkides tuleks mõõta vähemalt väljutamiskatse lõpus (näiteks üldjuhul seitse päeva pärast doosi või vähem, olenevalt uuritava kemikaali konkreetsest käitumisest). Kui uuringu lõpus uuritavat kemikaali kudedes ei tuvastata (näiteks kuna uuritav kemikaal võib olla enne uuringu lõppu lühikese poolestusaja tõttu juba kadunud), siis tuleks olla hoolikas, et vältida andmete väärtõlgendamist. Sellises olukorras tuleks uurida uuritava kemikaali (ja/või metaboliidi) jaotumist kudedes sel ajal, kui selle kontsentratsioon plasmas/veres on maksimaalne (T_{max}) või kui selle väljutamine uriini kaudu on kõige kiirem, nagu on asjakohane (vt punkt 38). Lisaks sellele võib olla vajalik kudede kogumine täiendavatel ajahetkedel, et hinnata uuritava kemikaali ja/või selle metaboliitide kudedes jaotumise sõltuvust ajast (kui see on asjakohane), et hõlbustada massibilansi määramist ja/või täita pädeva ametiasutuse esitatud nõudeid. Kogutavate kudede hulka kuuluvad maks, rasvkude, magu ja soolestik, neerud, põrn, täisveri, korjusejäägid, sihtorgani koed, samuti tuleks koguda uuritava kemikaali toksikoloogilise hindamise jaoks võimalikku tähtsust omavaid muid kudesid (näiteks kilpnääre, erütrotsüüdid, suguelundid, nahk, silm (eelkõige pigmenteerunud loomade puhul)). Tuleks kaaluda täiendavate kudede analüüsi samadel ajahetkedel, et kasutada loomi maksimaalselt, samuti juhul, kui subkroonilise või kroonilise mürgisuse uuringutes täheldatakse mürgisust sihtorgani suhtes. Samuti tuleks teatada (radioaktiivsete) jääkide kontsentratsioon ning kudede ja plasma (vere) radioaktiivsuse suhtarvud.

38. Kudedes jaotumise hindamine täiendavatel ajahetkedel, näiteks siis, kui kontsentratsioon plasmas/veres on maksimaalne (näiteks T_{max}) või kui väljutamine uriini kaudu toimub suurima kiirusega, mis on kindlaks tehtud vastavate plasma/vere kineetika või väljutamise katsetega, võib samuti olla vajalik või seda võib nõuda pädev asutus. See teave võib olla vajalik mürgisuse mõistmiseks ning uuritava kemikaali ja metaboliidi bioakumulatsiooni ja püsivuse võimalikkuse hindamiseks. Tuleks esitada proovide valiku põhjendused; analüüsiproovid peaksid üldjuhul olema samad kui eespool nimetatud (vt punkt 37).

▼M4

39. Kudedes jaotumise uuringutes võidakse radioaktiivsuse arvuline määramine teha vedelik-stsintillatsiooniloenduri (VSL) abil pärast seda, kui organid on välja lõigatud, homogeenitud, põletatud ja/või solubiliseeritud ning nende jäägid on kogutud ja viidud loendurisse. Praegu arendatakse mitut tehnilist meetodit, nagu kvantitatiivne kogu keha autoradiograafia ja retseptori mikroskoop-autoradiograafia, mis võivad osutuda kasulikuks uuritava kemikaali organites ja/või kudedes jaotumise määramisel (3, 4).

40. Muu kui suukaudse kokkupuute puhul tuleks koguda ja analüüsida konkreetseid kudesid, näiteks inhalatsiooniuuringute puhul kopse ja nahakaudsete uuringute puhul nahka. Vt punktid 74–78.

Metaboliseerimine

41. Väljaheited (ja plasma, kui see on asjakohane) tuleks koguda muutumata uuritava kemikaali ja metaboliitide tuvastamiseks ja arvuliseks määramiseks, nagu on kirjeldatud punktides 44–49. Metaboliitide tuvastamise lihtsustamiseks on lubatav koondada ühe doosirühma väljaheited. Soovitatav on iga ajahetke jaoks määrata metaboliidiprofiil. Kui proovide ja/või radioaktiivsuse puudumine seda ei võimalda, siis on lubatud koondada mitme ajahetke uriin ja fekaalid, kuid sugude- ja doosidevaheline koondamine ei ole lubatud. Uuritava kemikaaliga töödeldud loomade uriini, fekaalide, väljahingatud radioaktiivsuse ja sapi (kui see on asjakohane) analüüsimiseks tuleks kasutada sobivaid kvalitatiivseid ja kvantitatiivseid meetodeid.

42. Tuleks teha mõistlikud jõupingutused, et määrata kindlaks kõik metaboliidid, mille kogus on vähemalt 5 % manustatud doosist, ning esitada uuritava kemikaali metaboliseerimise skeem. Tuleks kindlaks teha uuritavad kemikaalid, mida on väljaheidetes vähemalt 5 % manustatud doosist. Tuvastamine tähendab siin koostisainete täpse struktuuri määramist. Üldiselt toimub keemilise struktuuri määramine nii, et metaboliiti ja teadaolevaid võrdlusaineid kromatografeeritakse kahes erinevas süsteemis, või kasutatakse meetodeid, mille abil on võimalik otse määrata keemilist struktuuri, näiteks massispektromeetria, tuumamagnetresonants jne. Kromatograafia puhul ei peeta metaboliidi struktuuri kahe meetodi abil tõendamisel piisavaks seda, kui kromatograafiat tehakse kahe erineva lahustisüsteemiga, kuid sama statsionaarse faasiga, kuna need meetodid ei ole sõltumatud. Kromatograafiline tuvastamine peaks toimuma kahe sõltumatu analüüsisüsteemiga, näiteks tavaline ja pöördfaasi õhukese kihi kromatograafia ning kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC). Kui kromatograafiline eraldamine on piisava kvaliteediga, ei ole täiendav spektroskoopiline kinnitamine vajalik. Alternatiivselt võib ühese tuvastamise saavutada struktuuriteavet andvate meetoditega, näiteks vedelikkromatograafia pluss massispektromeetria (LC-MS) või vedelikkromatograafiaga tandemisse ühendatud massispektromeetria (LC-MS/MS), gaaskromatograafia pluss massispektromeetria (GC-MS) ning tuumamagnetresonantsspektromeetria.

43. Kui ei ole võimalik tuvastada metaboliite, mida on vähemalt 5 % manustatud doosist, tuleks lõpparuandes seda põhjendada või selgitada. Võib olla asjakohane tuvastada sellised metaboliidid, mille kogus on vähem kui 5 % manustatud doosist, et ohu ja/või riski hindamiseks mõista paremini uuritava kemikaali metaboliseerimisteed. Võimaluse korral tuleks esitada struktuuri kinnitus. See võib hõlmata plasmas, veres või muudes kudedes tekkivate metaboliidiprofiilide esitamist.

▼M4

Eritumine

44. Tuleks kindlaks teha manustatud doosi eritumise kiirus ja ulatus; selleks mõõdetakse uriinis, fekaalides ja väljahingatud õhus leitud (radioaktiivse) doosi protsent. Neid andmeid saab kasutada ka massibilansi määramiseks. Uriini, fekaalide ja väljahingatud õhuga organismist väljunud uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) kogused tuleks kindlaks määrata sobivate ajavahemike järel (vt punktid 47–49). Korduvdoosi katsed tuleks asjakohaselt kavandada, et eritumise andmete kogumisel oleks võimalik järgida punktis 26 sätestatud eesmärke. See võimaldab võrdlemist ühe doosi katsetega.

45. Kui prooviuuringust selgub, et uuritavat kemikaali (radioaktiivsust) (punkti 49 kohaselt) ei ole väljahingatud õhuga märkimisväärses koguses väljutatud, ei ole lõpliku uuringu ajal vaja väljahingatud õhku koguda.

46. Iga loom tuleb paigutada eraldi metaboolsesse üksusesse väljaheidete (uriini, fekaalide) ja väljahingatud õhu kogumiseks. Iga kogumisajavahemiku lõpus (vt punktid 47–49) tuleks metaboolsed üksused asjakohase lahustiga loputada (seda nimetatakse puuri loputamiseks), et tagada uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) maksimaalne kogumine. Väljaheidete ja väljahingatud õhu kogumine tuleks lõpetada seitsme päeva möödudes või kui vähemalt 90 % manustatud doosist on kogutud, olenevalt sellest, kumb kriteerium enne täidetakse.

47. Uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) summaarsed kogused uriinis määratakse kindlaks vähemalt kahel ajahetkel kogumise 1. päeva kohta, millest üks peaks olema 24 tundi pärast doseerimist, ja seejärel üks kord päevas kuni uuringu lõpuni. Soovitatav on 1. päeval kasutada rohkem kui kahte proovi kogumise ajahetke (näiteks 6, 12 ja 24 tundi pärast doseerimist) valimist. Prooviuuringute tulemusi tuleks analüüsida, et saada teavet proovi kogumise alternatiivsete või täiendavate ajavahemike kohta. Kogumise ajakava tuleks põhjendada.

48. Uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) summaarsed kogused fekaalides tuleks kindlaks määrata iga päev pärast 24 tunni möödumist manustamisest kuni uuringu lõpuni, v.a juhul, kui prooviuuringutest tuleneb, et kogumiseks tuleb kasutada muid või täiendavaid ajavahemikke. Kogumise alternatiivset ajakava tuleks põhjendada.

49. Väljahingatud CO_2 ja muude lenduvate materjalide kogumise võib konkreetses uuringus peatada, kui väljahingatud õhus leitakse pärast 24-tunnist kogumist vähem kui 1 % manustatud doosist.

Mõju ajast sõltuvuse uuringud

Plasma/vere kineetika

50. Kõnealuste uuringute eesmärk on hinnata uuritava kemikaali peamised toksiko-kineetilised parameetrid (näiteks C_{max}, T_{max}, poolestusaeg ($t_{1/2}$), plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC)). Kõnealused uuringud võib teha ühe doosiga või tõenäolisemalt kahe või enama doosiga. Doosid tuleks valida eksperimendi laadi ja/või uuritava probleemküsimuse alusel. Kineetilised andmed võivad olla vajalikud, et lahendada selliseid küsimusi nagu uuritava kemikaali biosaadavus ja/või selgitada, kuidas kehast väljutamine sõltub doosist (näiteks selgitada, kas väljutamisel esineb küllastumine alates mingist doosist).

51. Kõnealuste uuringute puhul tuleks kasutada doosirühmas vähemalt nelja ühest soost looma. Kasutatud loomade soo valikut tuleks põhjendada. Tuleks kaaluda mõlema soo kasutamist (neli isas- ja neli emaslooma), kui on tõendeid, et mürgisus oleneb oluliselt soost.

▼M4

52. Pärast (radiomärgistatud) uuritava kemikaali manustamist tuleks igalt loomalt võtta sobival ajal vereproovid, kasutades asjakohast proovivõtu metoodikat. Loomalt võetavate vereproovide kogus ja arv võib olla piiratud korduva proovivõtu võimaliku mõjuga looma tervisele/füsioloogiale ja/või analüüsimeetodi tundlikkusega. Iga looma proove tuleks analüüsida eraldi. Mõnikord (näiteks metaboliidi iseloomustamine) võib olla vajalik rohkem kui ühe looma proovide koondamine. Koondatud proovid tuleks selgelt märgistada ja esitada koondamise selgitus. Kui kasutatakse radiomärgistatud uuritavat kemikaali, siis võib olla vajalik esineva koguradioaktiivsuse analüüs. Kui see on nii, tuleks radioaktiivsust analüüsida täisveres ja plasmas või plasmas ja punastes vereliblede, et oleks võimalik arvutada vere ja plasma omavahelist suhet. Muudel juhtudel võivad olla vajalikud täpsemad uuringud, mille puhul on vaja määrata lähteühendit ja/või metaboliite või hinnata nende seostumist valkudega.

Muude kudede kineetika

53. Kõnealuste uuringute eesmärk on hankida teavet mõju ajast sõltuvuse kohta, et saada vastused sellistele küsimustele nagu mürgisuse mehhanism, bioakumulatsioon ja biopüsivus, milleks määratakse kindlaks uuritava kemikaali sisaldus eri kudedes. Kudede ja hindamisajavahemike valik oleneb käsitletavast küsimusest ning uuritava kemikaali toksikoloogilisest andmebaasist. Kõnealuse täiendavate kudede kineetikauuringu kavandamisel tuleks võtta arvesse kogutud teavet, nagu on kirjeldatud punktides 37–40. Kõnealused uuringud võivad hõlmata ühe või mitme doosi manustamist. Kasutatavat lähenemisviisi tuleks üksikasjalikult põhjendada.

54. Muude kudede kineetiliste uuringute tegemise võimalikud põhjused on järgmised:

— tõendid pikendatud poolestusaja kohta veres, mis viitab uuritava kemikaali võimalikule kogunemisele mitmesugustes kudedes, või

— vajadus kindlaks teha, kas konkreetses koes on saavutatud statsionaarne olek (näiteks korduvdoosi uuringutes; kuigi veres võib uuritava kemikaali kontsentratsiooniga olla saavutatud statsionaarne olek, võib pakkuda huvi küsimus, kas statsionaarne olek on saavutatud ka sihtkudedes).

55. Seda tüüpi mõju ajast sõltuvuse uuringutes tuleks asjakohane uuritava kemikaali doos manustada suukaudselt vähemalt neljale loomale iga doosi ja iga määratud ajahetke kohta ning tuleks jälgida valitud kudedes jaotumise ajalist kulgu. Võib kasutada ainult ühte sugu, v.a juhul, kui on täheldatud mürgisuse sõltuvust soost. See, kas analüüsitakse summaarset radioaktiivsust või lähtekemikaali ja/või metaboliite, oleneb ka probleemküsimusest, millega tegeldakse. Kudedes jaotumist tuleks hinnata asjakohaste meetodite abil.

Ensüümide induktsioon või inhibeerimine

56. Ensüümide induktsiooni (sünteesi esilekutsumise) või inhibeerimise võimaliku mõju uurimine või uuritava kemikaali biotransformatsiooni uurimine võib olla vajalik järgmistel juhtudel:

1) olemasolevad tõendid osutavad, et uuritava kemikaali mürgisust suurendab biotransformatsioon;

2) olemasolevad tõendid osutavad, et metaboliseerimine ei sõltu doosist lineaarselt;

▼M4

3) metaboliitide määramise uuring näitab võimaliku mürgise metaboliidi olemasolu, mis võib olla tekkinud uuritava kemikaali poolt indutseeritud ensümaatilise raja kaudu;

4) on vaja kontrollida hüpoteesi, et uuritava kemikaali mõju on seotud ensüümi induktsiooni nähtustega;

5) kui uuritava kemikaali metaboliseerimise profiilis täheldatakse kas märkimisväärseid toksikoloogilisi muutusi *in vitro* või *in vivo* katsetes muude liikidega või muudes tingimustes, võib olla vajalik asjakohas(t)e ensüümi(de) iseloomustamine (näiteks I faasi ensüümid, nagu tsütokroom P450-sõltuva monooksügenaasi süsteemi isoensüümid, II faasi ensüümid, nagu sulfotransferaasi isoensüümid või uridiindifosfaat-glükuronosüül-transferaasi isoensüümid või muud asjakohased ensüümid). Seda teavet võib kasutada, et hinnata mehhanismide liigilt liigile ülekandmise lubatavust.

57. Uuritava kemikaaliga seotud toksiko-kineetiliste muutuste hindamiseks tuleks kasutada sobilikke nõuetekohaselt valideeritud ja põhjendatud katse-eeskirju. Näidisuuringuprojekt hõlmab märgistamata uuritava kemikaaliga korduvdoosi manustamist, millele järgneb ühekordne radiomärgistatud doos 14. päeval või radiomärgistatud uuritava kemikaaliga korduvdoos ning proovide võtmine 1., 7. ja 14. päeval metaboliidiprofiilide kindlaksmääramiseks. Radiomärgistatud uuritava kemikaali dooside korduv manustamine võib anda teavet ka bioakumulatsiooni kohta (vt punkt 26).

TÄIENDAVAD LÄHENEMISVIISID

58. Muud lähenemisviisid, mis täiendavad käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* katseid, võivad teatavate liikide puhul anda kasulikku teavet uuritava kemikaali imendumise, jaotumise, metaboliseerimise või organismist kõrvaldamise kohta.

***In vitro* teabe kasutamine**

59. Mitmeid uuritava kemikaali metaboliseerimise küsimusi on võimalik käsitleda *in vitro* uuringutes, kasutades asjakohaseid katsesüsteeme. Võimalike metaboliitide uurimiseks võib kasutada maksa subtsellulaarse tasandi osakesi (näiteks mikrosoome ja tsütosooli või S9-fraktsiooni) ja värskelt eraldatud või kultuuris kasvatatud hepatotsüüte. Riskihindamisel võib huvi pakkuda lokaalne metaboliseerimine sihtorganis, näiteks kopsus. Selleks otstarbeks võib olla kasulik sihtkoe mikrosoomide fraktsioon. Mikrosoomiuuringud võivad olla kasulikud võimalike sooliste ja vanuseliste erinevuste selgitamiseks ning aidata leida ensüümiparameetreid (K_m ja V_{max}), mis võivad aidata hinnata metaboliseerimise sõltuvust doosist, arvestades kokkupuutetasemeid. Lisaks võivad mikrosoomiuuringud aidata määrata konkreetseid mikrosoomiensüüme, mis osalevad uuritava kemikaali metaboliseerimises ja mille mõju võib vahest oletada ka muude liikide puhul (vt ka punkt 56). Biotransformatsiooni induktsiooni võimalust võib samuti uurida, kasutades selliste loomade maksa subtsellulaarseid fraktsioone (näiteks mikrosoome ja tsütosooli), keda on eelnevalt töödeldud asjakohase uuritava kemikaaliga, tehes hepatotsüütide induktsiooni *in vitro* uuringuid või kasutades teatavaid rakuliine, milles sünteesitakse asjaomaseid ensüüme. Teatavatel asjaoludel ja sobivates tingimustes võib kaaluda inimkudedest pärinevate subtsellulaarsete fraktsioonide kasutamist biotransformatsiooni võimalike liigierinevuste kindlakstegemiseks. *In vitro* uuringud võivad olla kasulikud ka füsioloogial põhinevate toksikokineetika mudelite koostamiseks (5).

▼M4

60. Nahakaudse imendumise *in vitro* uuringutest võib saada lisateavet imendumise iseloomustamiseks (6).

61. Samasuguste küsimuste lahendamiseks, milleks kasutatakse maksa mikrosoome, võib kasutada ka maksa primaarsete rakkude kultuure ja värske koe lõikeid. Mõnikord võib konkreetsele küsimusele vastuse leidmiseks kasutada rakuliini, mille puhul asjakohase ensüümi ekspressioon on tõendatud, või insenergeneetilist rakuliini. Mõnel juhul võib olla kasulik uurida *in vitro* konkreetsete tsütokroomi P450 isosüümide (näiteks CYP1A1, 2E1, 1A2 ja muud) ja/või II faasi ensüümide induktsiooni ja inhibeerimist lähteühendi poolt. Saadud teave võib olla kasulik samalaadse struktuuriga ühendite puhul.

Mürgisusuuringute toksiko-kineetiliste andmete kasutamine lisateabena

62. Muude mürgisuse uuringute käigus saadud vere, kudede ja/või väljaheidete proovide analüüsist võib saada andmeid biosaadavuse, plasma kontsentratsiooni ajast sõltuvuse (plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC), C_{max}), bioakumulatsiooni võimalikkuse, kliirensi kiiruse ning metaboliseerimise ja kineetika sooliste erinevuste või vanuseliste muutuste kohta.

63. Uuringu projekti kavandamist võib kasutada vastuste leidmiseks küsimustele, mis on seotud järgmisega: imendumise küllastumine, biotransformatsioon või väljutamise teed suuremate dooside korral; uute metaboliseerimisradade sisselülitumine suurematel doosidel ning mürgiste metaboliitide esinemine vaid suurematel doosidel.

64. Muud ohu hindamisega seotud küsimused võivad olla näiteks järgmised:

— tundlikkuse sõltuvus vanusest seoses hematoentsefaalse barjääri, neerude ja/või detoksifitseerimisvõime ealiste muutustega;

— erinev tundlikkus alampopulatsioonides biotransformatsioonivõime või muude toksiko-kineetiliste erinevuste tõttu;

— kokkupuute ulatus loote puhul, kuna kemikaal suudab läbida platsentat, või vastsündinu puhul, kuna kemikaal läheb rinnapiima sisse.

Toksiko-kineetilise modelleerimise kasutamine

65. Toksiko-kineetilised mudelid võivad olla kasulikud ohu ja riski hindamise erinevate tahkude jaoks, näiteks süsteemse kokkupuute ning koesisese doosi ennustamine. Lisaks sellele võidakse käsitleda toimeviisiga seotud konkreetseid küsimusi ja need mudelid võivad olla aluseks andmete ekstrapoleerimisel muudele liikidele, kokkupuuteteedele ja doseerimismustritele ning aidata hinnata inimest ohustavat riski. Uuritava kemikaali füsioloogial põhineva toksiko-kineetilise mudeli koostamiseks kasulikud andmed on iga liigi puhul järgmised: 1) jaotuskoefitsiendid, 2) biokeemilised konstandid ja füsioloogilised parameetrid, 3) manustamisteest sõltuvad imendumise parameetrid ning 4) *in vivo* kineetilised andmed mudeli hindamiseks (näiteks asjakohaste (> 10 %) väljutamisteede kaudu organismist väljaviimise (kliirensi) parameetrid, metaboliseerimise K_m ja V_{max}). Mudeli koostamisel kasutatavad katseandmed tuleks saada teaduslikult põhjendatud meetodeid kasutades ning mudeli tulemused tuleks valideerida. Sageli määratakse uuritava kemikaali ja liigipõhised parameetrid, näiteks imendumise kiirused, veres ja kudedes jaotumise ning metaboliseerimise kiiruse konstandid, et lihtsustada mittekompartmentaalsete või füsioloogial põhinevate mudelite koostamist (7).

▼**M4**

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

66. Uuringu protokoll soovitatakse varustada sisukorraga.

Protokolli tekstiosa

67. Protokolli tekstiosa peaks sisaldama kõnealuse katsemeetodiga hõlmatud teavet, mis on jaotatud osadesse ja lõikudesse järgmiselt.

Kokkuvõte

68. See uuringuprotokolli osa peaks sisaldama uuringuprojekti ülevaadet ja kasutatud meetodite kirjeldust. Selles tuleks samuti tuua esile peamised tulemused, mis on seotud massibilansi, metaboliitide laadi ja olulisuse, kudedes olevate jääkide, kliirensi kiirusega, bioakumulatsiooni võimalikkuse, sooliste erinevustega jne. Ülevaade tuleks esitada piisavalt üksikasjalikult, et uuringu tulemusi oleks võimalik hinnata.

Sissejuhatus

69. See uuringuprotokolli osa peaks sisaldama uuringu eesmärke, põhjendust ja kava ning asjakohaseid viiteid ja taustteavet.

Materjalid ja meetodid

70. Selles uuringuprotokolli osas tuleks esitada kogu asjakohase teabe üksikasjalik kirjeldus, mis hõlmab järgmist.

a) Uuritav kemikaal

Selles jaotises tuleks esitada uuritava kemikaali tunnusandmed: keemiline nimetus, molekuli struktuur, keemilise koostise kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine, keemiline puhtus ja võimaluse korral lisandite tüüp ja kogused. Samuti esitatakse teave füüsikaliste ja keemiliste omaduste kohta, sh füüsikaline olek, värvus, lahustuvus ja/või jaotuskoefitsient, stabiilsus ja vajaduse korral söövitav toime. Kui see on kohaldatav, tuleks esitada isomeere käsitlev teave. Radiomärgistatud uuritava kemikaali kohta tuleks selles jaotises esitada järgmine teave: radionukliidi tüüp, märgise asukoht, eriaktiivsus ja radiokeemiline puhtus.

Tuleks esitada kandeaine, lahjendusvedeliku, suspendeerimisvahendi ja emulgaatori või muude uuritava kemikaali manustamisel kasutatavate materjalide tüüp või kirjeldus.

b) Katseloomad

Selles jaotises peaks olema teave katseloomade, sh nende valimise kohta; tuleks põhjendada, miks valiti konkreetne liik, liin ja loomade vanus uuringu alguses, sugu, ning esitada andmed kehakaalu, tervisliku seisundi ja loomade pidamise tingimuste kohta.

c) Meetodid

See jaotis peaks sisaldama andmeid uuringu kava ja kasutatud meetodi kohta. Tuleks kirjeldada järgmist:

1) kokkupuutetee ja -tingimuste kõigi muudatuste põhjendus, kui see on kohaldatav;

▼M4

2) doositasemete valiku põhjendus;

3) põhiuuringu eksperimentaalse osa kavandamiseks tehtud prooviuuringute kirjeldus, kui see on kohaldatav. Tuleks esitada prooviuuringu alusandmed;

4) kuidas valmistati doseerimislahus ning lahusti või kandeaine tüüp, kui seda kasutati;

5) katserühmade arv ja loomade arv rühmas;

6) doositasemed ja kogus (ning doosi eriaktiivsus, kui kasutati radioaktiivset märgist);

7) manustamistee(d) ja -meetodid;

8) manustamise sagedus;

9) näljutamise ajavahemik (kui loomi näljutati);

10) summaarne radioaktiivsus looma kohta;

11) loomade kohtlemine;

12) proovide kogumine ja ettevalmistamine;

13) metaboliitide eraldamiseks, koguse määramiseks ja kindlakstegemiseks kasutatud analüüsimeetodid;

14) kasutatud meetoditega tuvastamise piir;

15) muud kasutatud eksperimentaalsed mõõtmised ja protseduurid (sh metaboliitide analüüsi meetodite valideerimine).

d) Statistiline analüüs

Kui uuringutulemuste analüüsimiseks kasutati statistilist analüüsi, tuleks lisada piisav teave kasutatud analüüsimeetodi ja arvutiprogrammi kohta, et sõltumatu hindaja või statistik saaks analüüsi uuesti hinnata ja rekonstrueerida.

Kui tehakse süsteemi modelleerimise uuringuid, nagu füsioloogial põhineva toksikokineetika mudeli uuring, tuleks mudel esitada koos täieliku kirjeldusega, et mudelit saaks sõltumatult rekonstrueerida ja valideerida (vt punkt 65 ja liide „Mõisted”)

Tulemused

71. Kõik andmed tuleks esitada tabelites koos asjakohase statistilise töötlusega, andmete kokkuvõte tuleks esitada kõnealuse jaotise tekstiosas. Uuringu jaoks asjakohasel viisil tuleks esitada radioaktiivsuse loendusandmete kokkuvõte; üldiselt esitatakse andmed mikro- või milligrammekvivalentidena proovi massiühiku kohta, kuid võib kasutada ka muid ühikuid. Selles jaotises tuleks tulemused esitada graafiliselt, lisada tüüpilised kromatograafia ja spektromeetria graafilised andmed, metaboliitide tuvastamise ja kvantitatiivse määramise graafikud, oletatavad metaboliseerimisteed, sh metaboliitide molekulaarne struktuur. Kõnealuses jaotises esitatakse veel järgmine teave, kui see on kohaldatav:

1) radioaktiivsuse kogus ja taasleitud radioaktiivsuse protsent uriinis, fekaalides, väljahingatud õhus ning uriini ja fekaale sisaldavas puuriloputusvedelikus.

— Nahakaudse uuringu puhul tuleks samuti lisada andmed manustamiskoha nahast ja nahaloputusest uuritava kemikaali taasleidmise kohta ning jääkradioaktiivsuse kohta nahka katnud seadmetes ja metaboliseerimise uurimise üksuses ning samuti nahaloputusuuringu tulemused. Üksikasjalikuma käsitluse kohta vt punktid 74–77.

▼M4

— Inhalatsiooniuuringute puhul lisage samuti andmed uuritava kemikaali taasleidmise kohta kopsudes ja nina kudedes (8). Üksikasjalikuma käsitluse kohta vt punkt 78;

2) jaotus kudedes protsendina manustatud doosist ja kontsentratsioonina (mikrogramm-ekvivalente koe grammi kohta) ning koes ja veres leiduva kemikaali või koes ja plasmas leiduva kemikaali suhtena;

3) materjalibilanss, mis on arvutatud igast uuringust, mis hõlmab kehakudede ja väljaheidete analüüsimist;

4) plasmakontsentratsioonid ja toksiko-kineetilised parameetrid (biosaadavus, plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC), Cmax, Tmax, kliirens, poolestusaeg) pärast asjakohas(t)e kokkupuutetee(de) kaudu manustamist;

5) uuritava kemikaali imendumise kiirus ja ulatus pärast asjakohas(t)e kokkupuutetee(de) kaudu manustamist;

6) väljaheidetest kogutud uuritava kemikaali ja metaboliitide kogused (väljendatuna manustatud doosi protsendina);

7) viide liite andmetele, mis sisaldavad kõiki mõõdetud näitajate andmeid iga üksiku looma kohta (näiteks doosi manustamine, taasleitud koguse protsent, kontsentratsioonid, toksiko-kineetilised parameetrid jne);

8) väljapakutud metaboliseerimisteede joonis ning metaboliidimolekulide struktuurid.

Arutelu ja järeldused

72. Selles jaotises peaks(id) autor(id)

1) esitama uuritava kemikaali metaboliseerimistee, toetudes metaboliseerimise ja organismist kõrvaldamise tulemustele;

2) käsitlema uuritava kemikaali organismist kõrvaldamise ja/või biotransformatsiooni kõiki võimalikke liikide- ja sugudevahelisi erinevusi;

3) esitama tabelina andmed metaboliitide tuvastamise ja koguste, kliirensi ja bioakumulatsiooni võimalikkuse kohta, lähteaine ja/või metaboliidi/metaboliitide jääkide taseme kohta kudedes ning toksikokineetika parameetrite võimaliku doosist sõltuva muutumise kohta, nagu on asjakohane, ja arutama kõike nimetatut;

4) lisama kõnealusesse jaotisesse kõik asjakohased mürgisuse uuringutest saadud toksiko-kineetilised andmed;

5) esitama lühikese järelduse, mida toetavad kõnealuse uuringu tulemused;

6) lisama jaotisi (kui see on vajalik või asjakohane).

73. Kirjanduse andmete, tabelite, jooniste, liidete jne lisamiseks tuleks kasutada täiendavaid jaotisi.

▼M4

ALTERNATIIVSED KOKKUPUUTETEED

Nahakaudne

Nahakaudne töötlemine

74. Selles jaotises esitatakse üksikasjalik teave uuritava kemikaali toksikokineetika uurimise kohta nahakaudse kokkupuute korral. Nahakaudse imendumise kohta tuleks vaadata käesoleva lisa peatükki B.44 („Nahakaudne imendumine: *in vivo* meetod" (9)). Muude näitajate puhul, näiteks jaotumine ja metaboliseerimine, võib kasutada käesolevat katsemeetodit B.36. Nahakaudsel töötlemisel tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte või enamat doositaset. Uuritav kemikaal (st puhas, lahjendatud või segu koostisse viidud materjal, mis sisaldab nahale kantavat uuritavat kemikaali) peaks olema sama, millega inimene või muu loomaliigi esindaja võib kokku puutuda (või selle lähedane aseaine). Doositase(med) tuleks valida kooskõlas käesoleva katsemeetodi punktidega 20–26. Asjaolud, mida võiks nahakaudse doosi valimisel arvesse võtta, on eeldatav inimeste kokkupuude ja/või doosid, mille juures muudes nahakaudsete mürgisuse uuringutes täheldati mürgisust. Nahakaudne (nahakaudsed) doos(id) tuleks vajaduse korral lahustada sobivas kandeaines ning peale kanda mahus, mis on piisav doosi manustamiseks. Vahetult enne katset eemaldatakse pügamise teel katselooma keha seljaosalt karvkate. Võib kasutada raseerimist, kuid seda tuleb teha umbes 24 tundi enne uuringu algust. Karvkatte pügamisel või raseerimisel tuleks vältida naha marrastamist, kuna see võib mõjutada naha läbilaskvust. Uuritava kemikaali manustamiseks tuleks paljastada ligikaudu 10 % keha pinnast. Väga toksilise aine puhul võib kasutada väiksemat nahapinda kui ligikaudu 10 %, kuid võimalikult suur osa alast tuleks katta õhukese ja ühtlase kihiga. Kõigi nahakaudse kokkupuute katserühmade puhul tuleks kasutada sama töötlemise pindala. Doosiga kaetud alasid tuleb kaitsta sobiva kattega, mis kinnitatakse paigale. Loomi tuleks pidada eraldi.

75. Tuleks teha naha pesemise uuring, et hinnata pealekantud uuritava kemikaali kogust, mida on võimalik töödeldud nahalt pehmetoimelise seebi ja veega pesemise teel eemaldada. Uuritava kemikaali nahakaudse manustamise korral võib kõnealune uuring aidata koostada ka massibilanssi. Kõnealuse naha pesemise uuringu jaoks tuleks kahele loomale kanda peale üks doos uuritavat kemikaali. Doositase valitakse vastavalt käesoleva katsemeetodi punktile 23 (vt ka nahaga kokkupuute aja käsitlus, punkt 76). Pesemisel maha tulevad uuritava kemikaali kogused tuleks määrata, et hinnata, kui tõhus on uuritava kemikaali eemaldamine pesemise teel.

76. Uuritav kemikaal tuleks kanda nahale ja hoida seda nahal vähemalt kuus tundi, kui seda ei välista kemikaali söövitav toime. Pärast katte eemaldamist tuleks töödeldud pinda pesta, järgides naha pesemise uuringu jaoks kirjeldatud korda (vt punkt 75). Nii katet kui ka pesuvedelikku tuleks analüüsida uuritava kemikaali jääkide kindlakstegemiseks. Uuringu lõpus tuleks iga loom kooskõlas punktiga 2 humaansel viisil surmata ja töödeldud nahk tuleks eemaldada. Töödeldud naha asjakohast osa tuleks analüüsida, et määrata kindlaks uuritava kemikaali jäägid (radioaktiivsus).

77. Ravimite toksiko-kineetiliseks hindamiseks võivad vajalikud olla erinevad protseduurid kooskõlas asjakohase õigusraamistikuga.

▼M4

Hingamisteede kaudu

78. Tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte kontsentratsiooni (või vajaduse korral mitut kontsentratsiooni). Kontsentratsioon(id) tuleks valida kooskõlas käesoleva katsemeetodi punktidega 20–26. Sissehingamise teel manustamine tehakse nn ninakoonuse või ainult peaseadme abil, et vältida imendumist muude kokkupuuteteede kaudu (8). Kui kasutatakse muid sissehingamise teel toimuva kokkupuute tingimusi, tuleks tingimuste muutmine dokumenteerida. Sissehingamise teel toimuva kokkupuute kestus tuleks kindlaks määrata; tavaline kokkupuuteaeg on 4–6 tundi.

KIRJANDUS

1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73–81.

4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25–40.

5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400–411.

6) Käesoleva lisa peatükk B.45 „Nahakaudne imendumine: *in vitro* meetod".

7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Käesoleva lisa peatükk B.44 „Nahakaudne imendumine: *in vivo* meetod".

10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Liide

MÕISTED

ADME – lühend sõnadest *Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion* (imendumine, jaotumine, metaboliseerimine ja väljutamine).

Akumulatsioon (bioakumulatsioon) – uuritava kemikaali koguse suurenemine aja jooksul kudedes (tavaliselt rasvkoes, korduva kokkupuute korral); kui uuritava kemikaali kehasse sisenemise kiirus on suurem kui kehast väljaviimise kiirus, siis organism akumuleerib uuritavat kemikaali ja võib tekkida uuritava kemikaali toksiline kontsentratsioon.

Analoogmeetod – ühe või enama kemikaali näitajaid käsitleva teabe kasutamine sihtkemikaali näitajate prognoosimiseks.

AUC (plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala) – plasmas oleva uuritava aine kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala. See vastab eelnevalt kindlaks määratud aja jooksul kehasse imendunud uuritava kemikaali üldkogusele. Lineaarsetes tingimustes on AUC (aja nullpunktist lõpmatuseni) võrdelises sõltuvuses kehasse imendunud uuritava kemikaali summaarsest kogusest, olenemata imendumise kiirusest.

Autoradiograafia (kogu keha autoradiograafia) – seda kasutatakse koes radioaktiivse uuritava kemikaali asukoha kvalitatiivseks ja/või kvantitatiivseks kindlaksmääramiseks; selle meetodi puhul kasutatakse röntgenfilmi või viimasel ajal digitaalseid fosforkujutisi, et visualiseerida radioaktiivselt märgistatud molekule või molekuliosi, salvestades uuritava objekti kiiratud radioaktiivsuse. Kvantitatiivsel kogu keha autoradiograafial võivad uuritava kemikaali jaotumise hindamisel ning kudedes radioaktiivse aine taasleitud üldkoguse ja lahutusvõime hindamisel olla mõned eelised võrreldes organite lahkamisega. Üks oluline eelis näiteks on võimalus kasutada seda pigmenteeritud loomamudeli puhul, et hinnata uuritava kemikaali võimalikku sidumist melaniiniga, mis võib teatavaid molekule siduda. Kuigi see meetod võib suure mahu ja vähese afiinsusega sidumiskohtadest kogu kehas ülevaate saamiseks olla kasulik, võib meetod olla piiratud konkreetsete sihtobjektide tuvastamisega, näiteks retseptorsidumiskohtade tuvastamisega, mille puhul tuvastamiseks on vaja suhteliselt suurt eraldusvõimet ja tundlikkust. Kui kasutatakse autoradiograafiat, tuleks manustatud ühendi massibilansi määramiseks kavandatud katsed teha eraldi rühmas või eraldi uuringuna kudedes jaotumise katsest, kus kõik väljaheited (mis võivad samuti hõlmata väljahingatud õhku) ja terved korjused homogeenitakse ja neid analüüsitakse vedelik-stsintillatsiooniloenduri abil.

Bioakumulatsioon – vaata „akumulatsioon”.

Biopüsivus – vt „püsivus”.

Biosaadavus – manustatud doosi osa, mis jõuab süsteemsesse ringlusse või mis on füsioloogilise aktiivsuse kohas kättesaadav. Tavaliselt viitab uuritava kemikaali biosaadavus lähteühendile, kuid see võib viidata ka lähteühendi metaboliidile. Tegemist on ainult ühe keemilise vormiga. *Tähelepanu!* Biosaadavus ei ole sama, mis imendumine. Erinevus näiteks suukaudse imendumise (s.o olemasolu soolestiku seintes ja portaalringes) ja biosaadavuse (s.o olemasolu üldises vereringes ja kudedes) vahel võib muude tegurite hulgas (10) tekkida sellest, et soolte seinad metaboliseerivad (lagundavad) kemikaali, et kemikaal liigub väljavoolutranspordiga tagasi soolevalendikku või et kemikaal metaboliseeritakse maksas enne üldisse vereringesse sattumist. Mürgise komponendi (lähteühend või metaboliit) biosaadavus on inimest ohustava riski hindamisel ülioluline näitaja (suurelt väikesele doosile ekstrapoleerimine, ühelt kokkupuuteviisilt teisele ekstrapoleerimine), mida kasutatakse

▼M4

välise täheldatava kahjuliku toimeta doosi või võrdlusdoosi (kasutatud doos) alusel sisemise väärtuse tuletamiseks. Maksa mõju uurimiseks suukaudsel manustamisel piisab suukaudsest imendumisest. Kõigi muude mõjude puhul peale sisenemistee mõju on biosaadavus üldiselt usaldusväärsem näitaja edasises riskihindamises kasutamiseks kui imendumine.

Biotransformatsioon – asjakohase uuritava kemikaali (tavaliselt ensüümide toimel) keemiline muundamine kehas teiseks kemikaaliks. Sünonüümne metaboliseerimisega.

C_{max} – kas maksimaalne (tipp)kontsentratsioon veres (plasma/seerum) pärast manustamist või maksimaalne (tipp)kontsentratsioon väljutamisel (uriinis või fekaalides) pärast manustamist.

Detoksifitseerimise teed – etapid, mis viivad mürgiste kemikaalide kehast kõrvaldamisele kas metaboliseerimise või väljutamise teel.

Eksogeenselt – manustatud väljastpoolt organismi või süsteemi, tekkinud väljaspool organismi või süsteemi.

Ekstrapoleerimine – ühe või enama tundmatu väärtuse tuletamine selle alusel, mis on juba teada või mida on täheldatud.

Ensüümide parameetrid – K_m: Michaelise konstant ning V_{max}: maksimumkiirus.

Ensüümid/isosüümid – valgud, mis toimivad keemiliste reaktsioonide katalüsaatoritena. Isosüümid on ensüümid, mis katalüüsivad samalaadseid keemilisi reaktsioone, kuid mille aminohapete järjestus on erinev.

Imendumine – protsess(id), mille kaudu kemikaal tungib kudedesse või läbi kudede. Imendumisel peetakse silmas lähteühendit ja selle kõiki metaboliite. Seda ei tohiks segi ajada biosaadavusega.

Induktsioon / ensüümi induktsioon – ensüümi süntees keskkonnastiimuli või esilekutsuva molekuli tõttu.

Jaotumine – uuritava kemikaali ja selle derivaatide hajumine organismis.

Jaotumine kudedes – uuritava kemikaali pöörduv liikumine ühest asukohast kehas teise. Jaotumist kudedes on võimalik uurida organite lahkamise, homogeenimise, põletamise ja vedelik-stsintillatsiooniloenduri abil või kvalitatiivse ja/või kvantitatiivse kogu keha autoradiograafia abil. Esimene nimetatud meetod võimaldab leida kudedes ja sama looma korjusejääkides kontsentratsiooni ning sealt taasleidmise protsendi, kuid selle eraldusvõime ei pruugi olla piisav kõigi kudede jaoks ning summaarse taasleidmise jaoks (< 90 %) ei pruugi see parim lahendus olla. Vt summaarse taasleidmise selgitus eespool.

Jaotuskoefitsient – see näitaja iseloomustab kemikaali erinevat lahustuvust kahes lahustis.

Kliirens – selle kiiruse kvantitatiivne näitaja, millega uuritav kemikaal verest, plasmast või teatavast koest ajaühiku kohta kõrvaldatakse.

Kompartment – keha, koe või raku struktuurne või biokeemiline osa (või üksus), mis asub ülejäänust eraldi.

Küllastatus – seisund, milles üks või mitu kineetilist protsessi (näiteks imendumine, metaboliseerimine või kliirens) on maksimumis („küllastatud”).

Lineaarsus / lineaarne kineetika – protsessi kineetika on lineaarne, kui kõik kompartmentidevahelise ülekande kiirused on võrdelised olemasoleva koguse või kontsentratsiooniga, s.o esimest järku. Sel juhul on uuritava kemikaali kliirensi ja jaotunud kogused, samuti poolestusajad, konstantsed. Saavutatud kontsentratsioonid on võrdelised annustamise määraga (kokkupuutega) ja akumulatsioon on kergemini ennustatav. Lineaarsust/mittelineaarsust on võimalik hinnata, kui võrreldakse omavahel asjakohaseid parameetreid, näiteks uuritava aine kontsentratsiooni plasmas ja plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alust pindala (AUC) pärast erinevaid doose või pärast ühekordset ja korduvat kokkupuudet. Doosist sõltuvuse puudumine võib viidata ühendi metaboliseerimises osalevate ensüümide küllastatusele; plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera aluse pindala (AUC) suurenemine pärast korduvat kokkupuudet, võrreldes ühekordse kokkupuutega, võib viidata metaboliseerimise inhibeerimisele ning plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera aluse pindala (AUC) vähenemine võib viidata metaboliseerimise induktsioonile (vt ka punkt 11).

▼M4

Manustamistee (suukaudne, intravenoosne, nahakaudne, sissehingamine jne) – viitab viisile, kuidas kemikaali kehasse manustatakse (näiteks suukaudselt sondsöötmisega, suukaudselt söödaga, nahakaudselt, sissehingamise teel, intravenoosselt jne).

Massibilanss – uuritava kemikaali süsteemi sisenemise ja sealt väljumise arvestus.

Materjalibilanss – vt „massibilanss”.

Metaboliidid – metaboliseerimise või metaboliseerimisprotsesside saadused.

Metaboliseerimine – sünonüümne „biotransformatsiooniga”.

Mudelite valideerimine – protsess, millega hinnatakse mudeli sobivust olemasolevate toksiko-koneetiliste andmete järjepidevaks kirjeldamiseks. Mudeleid võib hinnata sel viisil, et mudeli prognoose võrreldakse statistiliselt ja visuaalselt katses saadud väärtustega ühise sõltumatu näitaja (näiteks aja) eri väärtuste juures. Hindamise ulatust tuleks mudeli kavandatava kasutusvaldkonna alusel põhjendada.

Mürgisuse (toimeviis) mehhanism / toimemehhanism (toimeviis) – toimemehhanism viitab konkreetsetele biokeemilistele mõjudele, mille kaudu tekib uuritava kemikaali mõju. Toimeviis viitab üldisematele teedele, mis põhjustavad uuritava kemikaali mürgisuse.

Poolestusaeg ($t_{1/2}$) – aeg, mille jooksul uuritava kemikaali kontsentratsioon väheneb kompartmendis poole võrra. Tavaliselt peetakse silmas uuritava kemikaali kontsentratsiooni plasmas või kogust kogu kehas.

Püsivus (biopüsivus) – kemikaali pikaajaline olemasolu (bioloogilises süsteemis) lagunemisele/kõrvaldamisele vastupidavuse tõttu.

Retseptori mikroskoopne autoradiograafia (või retseptori mikroautoradiograafia) – seda meetodit võib kasutada selleks, et uurida ksenobiootikumide sidumist konkreetsete koeelementide või rakupopulatsioonide poolt näiteks retseptorite sidumise või konkreetse toimeviisi uuringutes, mis võivad nõuda suurt eraldusvõimet ja suurt tundlikkust, mis ei pruugi olla saavutatavad muu meetodi, näiteks kogu keha autoradiograafia puhul.

Sapieritus – eritumine sapijuhade kaudu.

Sihtkude – kude, milles avaldub mürgise aine peamine kahjulik mõju.

Suukaudne imendumine – manustatud uuritava kemikaali doosi manustamise kohast (näiteks seedetraktist) imendumise protsent. Seda üliolulist parameetrit saab kasutada selleks, et määrata manustatud uuritava kemikaali osa, mis jõuab portaalveeni ja seejärel maksa.

Süsteemide modelleerimine (füsioloogial põhinev toksikokineetika, farmakokineetikal põhinev, füsioloogial põhinev farmakokineetika, bioloogial põhinev jne) – abstraktne mudel, milles süsteemi käitumist kirjeldatakse matemaatiliselt.

T_{max} – C_{max}-i saavutamiseks vajalik aeg.

Toksikokineetika (farmakokineetika) – kemikaalide imendumise, jaotumise, metaboliseerimise ja väljutamise ajast sõltuvuse uurimine.

▼**M4**

Tundlikkus – meetodi või mõõtevahendi suutlikkus eristada mõõdetavaid signaale, mis vastavad huvipakkuva muutuja erinevale sisaldusele.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Vere (plasma/seerumi) maksimaalsed tasemed – maksimaalne (tipp)kontsentratsioon veres (plasmas/seerumis) pärast manustamist (vt ka „C_{max}”).

Veres (plasmas) oleva kontsentratsiooni statsionaarne olek – avatud süsteemi mittetasakaaluline olek, mille puhul kõik süsteemile avalduvad mõjud on täpselt tasakaalustatud vastupidiste mõjude poolt selliselt, et kõigi selle komponentide kontsentratsioon on püsiv, kuigi ained voolavad läbi süsteemi.

Väljutamine – protsess(id), millega manustatud uuritav kemikaal ja/või selle metaboliidid kehast kõrvaldatakse.

▼B

B.37. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUS PÄRAST ÄGEDAT KOKKUPUUTUMIST

1. MEETOD

1.1. SISSEJUHATUS

Ainete toksilise toime iseloomustamisel ja hindamisel on oluline vaadelda teatavate aineklasside potentsiaali põhjustada spetsiifilist neurotoksilisust, mida ei pruugi olla võimalik teiste toksilisuse uuringutega tuvastada. Teatavad fosfororgaanilised ained põhjustavad viivistoimega neurotoksilisust ja neid tuleks pidada võimalikeks uurimisobjektideks.

Viivistoimega polüneuropaatiat põhjustada võivate ainete tuvastamiseks tuleks kasutada *in vitro* sõelumiskatseid; *in vitro* uuringute negatiivsed leiud ei tõenda, et uuritav aine ei ole neurotoksiline.

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Fosfororgaanilised ained sisaldavad laenguta fosfororgaanilisi estreid või fosfororgaaniliste või fosfoonorgaaniliste või orgaaniliste fosforamidohapete või analoogsete fosfortio, fosfoontio või fosfortioamidohapete tioestrid või anhüdriide, mis võivad põhjustada selle aineklassi puhul täheldatavat viivistoimega neurotoksilisust.

Viivistoimega neurotoksilisus on sündroom, mis on seotud pika viivitusega ataksia, seljaaju ja perifeerse närvi distaalse aksonopaatia ilmnemisel ja närvikoes neuropaatia sihtesteraasi (NTE) takistamise ja vananemisega.

1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusaineid võib uurida positiivse võrdlusrühmaga tõestamaks, et uuritava liigi vastus ei ole laboratoorsetel katsetingimustel märkimisväärselt muutunud.

Üks näide laialdaselt kasutatud neurotoksilisest ainest on tri-o-tolüül-3-fosfaat (CASi nr 78-30-8, EINECSi nr 201-103-5, CASi nomenklatuur: fosforhape, tris(2-metüülfenüül)ester), samuti tuntud kui tris-o-kresüülfosfaat.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine manustatakse suu kaudu ühekordse doosina kanadele, keda on vajaduse korral kaitstud ägedate kolinergiliste mõjude eest. Loomi vaadeldakse käitumuslike kõrvalekallete, ataksia ja paralüüsi tuvastamiseks 21 päeva. Biokeemilised mõõtmised, eelkõige neuropaatia sihtesteraasi pidurdamine (NTE), tehakse tavaliselt 24 ja 48 tundi pärast doosi andmist igast rühmast juhuslikkuse printsiibil valitud kanadel. 21 päeva pärast kokkupuudet tapetakse ülejäänud kanad ning seejärel viiakse läbi valitud närvikudede histopatoloogiline uuring.

▼B

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. **Ettevalmistused**

Noored terved täiskasvanud kanad, kellel ei esine takistavaid viirushaigusi, kellele ei manustata ravimeid ja kelle kõnnakus ei esine kõrvalekaldeid, jagatakse juhuslikkuse printsiibil katse- ja võrdlusrühmadesse ning seejärel lastakse neil vähemalt viis päeva enne uuringu algust laboritingimustega kohaneda.

Kasutada tuleks puure või piirdeaedu, mis on piisavalt suured, et kanad saaksid vabalt liikuda ja et neid saaks kergesti vaadelda.

Uuritav aine tuleks tavaliselt manustada sondi, želatiinikapslite või mõne samaväärse meetodi abil suu kaudu. Vedelikke võib anda lahjendamata kujul või sobivas vehiikelis (nt maisiõli) lahustatuna; tahked ained tuleks võimaluse korral lahustada, kuna suured kogused ei pruugi želatiinikapslites täielikult absorbeeruda. Mitte-vesilahuseliste vehiikelite puhul peaksid olema teada vehiikeli toksilised omadused ning kui need ei ole teada, tuleks need enne katse läbiviimist kindlaks teha.

1.5.2. **Katsetingimused**

1.5.2.1. *Katseloomad*

Soovitatakse kasutada noori, 8–12 kuu vanuseid täiskasvanud munakanu *(Gallus gallus domesticus)*. Kasutada tuleks normaalsuuruses ja -aretusliini kanu ning kanad peaksid üldjuhul olema kasvatatud tingimuses, kus neil oli võimalik vabalt liikuda.

1.5.2.2. *Arv ja sugu*

Lisaks katserühmale tuleks kasutada nii võrdlusrühma, millele antakse vehiikelit, kui ka positiivset võrdlusrüh-ma. Võrdlusrühma, millele antakse vehiikelit, tuleks käsitada samal viisil kui katserühma, välja arvatud uuritava aine manustamise osas.

Igas lindude rühmas peab olema piisav arv kanu, et biokeemiliste määramiste tegemiseks oleks võimalik tappa vähemalt kuus lindu (kolm lindu kahel eri ajahetkel) ja et kuus lindu jääksid ellu 21 päevase vaatlusperioodi ajaks patoloogiauuringu läbiviimiseks.

Positiivset võrdlusrühma võib uurida samaaegselt või hilisema võrdlusrühmana. Positiivses võrdlusrühmas peaks olema vähemalt kuus kana, kellele on manustatud tuntud viivistoimega neurotoksilist ainet, kolme kana puhul tehakse biokeemiline uuring ja kolmel kanal patoloogiline uuring. Varasemaid andmeid tuleks korrapäraselt ajakohastada. Uued positiivse võrdlusrühma andmed on vajalikud siis, kui katset tegev laboratoorium on mõnda katse tegemiseks olulist elementi (aretusliin, toit, pidamistingimused) muutnud.

▼B

1.5.2.3. *Annused*

Põhiuuringus kasutatav doositase tuleb määrata kindlaks eeluuringus, milles kasutatakse asjakohasel arvul kanu ja doositasemerühmasid. Selleks et määrata kindlaks piisav doos põhiuuringu jaoks, peab eeluuringus tavaliselt mõni lind surema. Vältimaks surma ägedate kolinergiliste mõjude tagajärjel, võib siiski kasutada atropiini või mõnda teist uuritavat ainet, mis teadaolevalt ei mõjuta viivistoimega neurotoksilisi reaktsioone. Uuritava aine mittesurmava maksimaalse doosi (vt meetod B.1a) määramiseks võib kasutada erinevaid uurimismeetodeid. Doosi valikul võib abi olla varasematest andmetest või muust toksikoloogilisest teabest.

Uuritava aine doositase peaks põhiuuringus olema võimalikult kõrge, võttes võimaluse korral arvesse doosivaliku eeluuringu tulemusi ja ülemist piirdoosi 2 000 mg kehakaalu kg kohta. Suremus ei tohiks olla nii suur, et see takistaks 21. päeval allesjäävate loomadega läbi viia biokeemilist uuringut (kuus katselooma) ja histoloogilist uuringut (kuus katselooma). Vältimaks surma ägedate kolinergiliste mõjude tagajärjel, võib kasutada atropiini või mõnda teist kaitseainet, mis teadaolevalt ei mõjuta viivistoimega neurotoksilisi reaktsioone.

1.5.2.4. *Piirsisalduskatse*

Kui katses ei tuvastata käesolevas uuringus kirjeldatud menetlusega päevadoosil 2 000 mg kehakaalu kg kohta täheldatavat toksilist toimet ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga ainete osas saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta suurema doosiga uuringut vajalikuks. Läbi võib viia piirsisalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

1.5.3. **Vaatlusperiood**

Vaatlusperiood peaks olema 21 päeva.

1.5.4. **Katse käik**

Pärast kaitseaine manustamist ägedast kolinergilisest toimest tuleneva surma vältimiseks manustatakse uuritav aine ühekordse doosina.

Üldine vaatlus

Vaatlused peaksid algama kohe pärast kokkupuudet. Kõiki kanu tuleks esimese kahe päeva jooksul mitu korda hoolikalt vaadelda ning seejärel 21 päeva jooksul või kuni kavandatud tapmiseni vähemalt kord päevas. Kõik toksilisuse märgid tuleks üles märkida, sealhulgas ilmnemise aeg, liik, raskusaste ja käitumuslike kõrvalekallete kestus. Ataksiat tuleks mõõta ordinaalse hindamisskaalaga, milles on vähemalt neli taset, ja paralüüsi esinemine tuleks registreerida. Patoloogilise uuringu jaoks välja valitud kanu tuleks vähemalt kaks korda nädalas puurist välja lasta ning neid tuleks väiksemate toksiliste mõjude hindamise hõlbustamiseks liikuma sundida (näiteks redelil ronimine). Haigestunud loomad ja loomad, kellel esineb suurt stressi või valu, eemaldatakse katsest, tapetakse humaanselt ja lahatakse.

▼B

Kehakaal

Kõiki kanu tuleks kaaluda vahetult enne uuritava aine manustamist ning seejärel vähemalt kord nädalas.

Biokeemia

Kuus juhuslikult valitud kana igast katserühmast ja võrdlusrühmast, millele antakse vehiikelit, ja kolm kana positiivsest võrdlusrühmast (kui katse viiakse läbi samaaegselt) tuleks tappa mõne päeva jooksul pärast viimase doosi manustamist ning ajust ja nimmelülidest valmistatud valmistist hinnatakse neuropaatia sihtesteraasi (NTE) pidurdamisaktiivsuse osas. Lisaks sellele tuleks neuropaatia sihtesteraasi pidurdamisaktiivsuseks ette valmistada ja analüüsida istmikunärvi kude. Tavaliselt tapetakse 24 ja 48 tunni pärast kolm võrdlusrühma ja iga katserühma lindu ning 24 tunni pärast tuleks tappa ka kolm positiivsesse võrdlusrühma kuuluvat lindu. Kui toksilisuse kliiniliste märkide vaatlus (mida on võimalik hinnata kolinergiliste märkide ilmnemise aja vaatlemisel) viitab toksilise aine eriti aeglasele kõrvaldamisele, on soovitav võtta kahel erineval ajahetkel 24–72 tunni jooksul pärast manustamist kolmelt linnult koeproov.

Vajaduse korral võib nende proovidega teha ka atsetüülkoliinesteraasi analüüsi (AChE). AChE võib siiski spontaanselt *in vivo* reaktiveeruda ja tuua kaasa selle, et aine potentsiaali AChE inhibiitorina alahinnatakse.

Täielik lahang

Kõikide loomade (kelle tapmine oli kavatsetud ja kes olid suremas) täielik lahang peaks hõlmama aju ja seljaaju väliste tunnuste vaatlemist.

Histopatoloogiline uuring

Vaatlusperioodil ellujäänud ja biokeemilistes uuringutes kasutamata loomade närvikude tuleks mikroskoopiliselt uurida. Koed tuleks kinnitada perfusiooni abil kohapeal. Lõiked tuleks võtta väikeajust (keskmiselt pikitasandilt), piklikajust, seljaajust ja perifeersetest närvidest. Seljaaju puhul tuleb lõiked võtta ülemistest kaelalülidest, kesktorakaalosast ja lumbosakraalosast. Tuleks võtta lõiked ka tibiaalnärvi distaalsest osast ja selle kaksiksääre-marjalihase harudest ja istmikunärvist. Lõiked tuleks katta sobivate müeliini- ja aksonispetsiifiliste ainetega.

2. **ANDMED**

Käesolevas meetodis valitud lõpp-punktide (biokeemia, histopatoloogia ja käitumuslik vaatlus) negatiivsed tulemused ei nõua tavapäraselt täiendavat uurimist viivistoimega neurotoksilisuse osas. Nendes lõpp-punktides saadud ebaselged või poolikud tulemused võivad nõuda täiendavat hindamist.

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Kõik andmed tuleks esitada kokkuvõtvalt tabelis, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, vigastustega loomade arv, toime käitumisele või biokeemiline toime, kahjustuste või toime liik ja raskusaste, loomade protsent iga tüüpi vigastuste ja raskusastmete kohta.

▼B

Käesoleva uuringu tulemusi tuleks hinnata käitumuslike, biokeemiliste ja histopatoloogiliste mõjude esinemise, raskusastme ja korrelatsiooni põhjal ja katse- või võrdlusrühmas täheldatud muude mõjude suhtes.

Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata asjakohaste ja üldiselt tunnustatud statistiliste meetoditega. Kasutatavad statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet

3.1. Katseloomad:

— kasutatud aretusliin;

— loomade arv ja vanus;

— päritolu, pidamistingimused, toit jne;

— iga looma kaal katse alguses.

3.2. Katsetingimused:

— uuritava aine ettevalmistamise, stabiilsuse ja homogeensuse üksikasjad; vajaduse korral;

— vehiikeli valiku põhjendus;

— uuritava aine manustamise üksikasjad;

— toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— doosi valimise põhjendused;

— manustatud dooside üksikasjad, sealhulgas andmed vehiikeli, mahu ja manustatud aine füüsilise vormi kohta;

— võimalike kaitseainete identifitseerimine ja nende manustamise üksikasjad.

3.3. Tulemused:

— kehakaalu andmed;

— toksilise reaktsiooni andmed vastavalt rühmale, sealhulgas suremus;

— kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);

— biokeemiliste meetodite ja leidude üksikasjalik kirjeldus;

— lahkamise tulemused;

— histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

Käesolev meetod on analoogne meetodiga OECD TG 418.

▼B

B.38. **FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUSE 28PÄEVANE KORDUSDOOSI UURING**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Ainete toksilise toime iseloomustamisel ja hindamisel on oluline vaadelda teatavate aineklasside potentsiaali põhjustada spetsiifilist neurotoksilisust, mida ei pruugi olla võimalik teiste toksilisuse uuringutega tuvastada. Teatavad fosfororgaanilised ained põhjustavad viivistoimega neurotoksilisust ja neid tuleks pidada võimalikeks uurimisobjektideks.

Nende ainete tuvastamiseks, mis võivad põhjustada viivistoimega polüneuropaatiat, tuleks kasutada *in vitro* sõelumiskatseid; *in vitro* uuringute negatiivsed leiud ei tõenda, et uuritav aine ei ole neurotoksiline.

Käesolev 28päevane viivistoimega neurotoksilisuse katse annab teavet võimalike ohtude kohta tervisele, mis võivad tõenäoliselt tuleneda korduvatest kokkupuudetest piiratud ajavahemiku jooksul. Nimetatud uuringuga saab teavet doosireaktsiooni kohta ning selle abil on võimalik hinnata täheldatava kahjuliku toimeta doosi taset, mis aitaks määrata kokkupuute ohutuskriteeriumeid.

Vt samuti B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Fosfororgaanilised ained sisaldavad laenguta fosfororgaanilisi estreid või fosfororgaaniliste või fosfoonorgaaniliste või orgaaniliste fosforamidohapete või analoogsete fosfortio, fosfoontio või fosfortioamidohapete tioestreid või anhüdriide, mis võivad põhjustada selle aineklassi puhul täheldatavat viivistoimega neurotoksilisust.

Viivistoimega neurotoksilisus on sündroom, mis on seotud pika viivitusega ataksia, seljaaju ja perifeerse närvi distaalse aksonopaatia ilmnemisel ja närvikoes neuropaatia sihtesteraasi (NTE) takistamise ja vananemisega.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritava aine päevaseid doose manustatakse kanadele suu kaudu 28 päeva jooksul. Loomi vaadeldakse vähemalt kord päevas käitumuslike kõrvalekallete, ataksia ja paralüüsi tuvastamiseks 14 päeva jooksul pärast viimase doosi manustamist. Biokeemilised mõõtmised, eelkõige neuropaatia sihtesteraasi pidurdamine (NTE), tehakse igast rühmast juhuslikkuse printsiibil valitud kanadel tavaliselt 24 ja 48 tundi pärast viimase doosi andmist. Kaks nädalat pärast kokkupuudet tapetakse ülejäänud kanad ning viiakse läbi valitud närvikudede histopatoloogiline uuring.

▼B

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Ettevalmistused**

Noortel tervetel täiskasvanud kanadel, kellel ei esine takistavaid viirushaigusi, kellele ei manustata ravimeid ja kelle kõnnakus ei esine kõrvalekaldeid, jagatakse juhuslikkuse põhimõtte alusel katse- ja võrdlusrühmadesse ning seejärel lastakse neil vähemalt viis päeva enne uuringu algust laboritingimustega kohaneda.

Kasutada tuleks puure või piirdeaedu, mis on piisavalt suured, võimaldades kanadel vabalt liikuda ja neid kergesti vaadelda.

Doosid tuleks manustada suu kaudu seitsmel päeval nädalas ning eelistatult sondi või želatiinikapslite abil. Vedelikke võib anda lahjendamata kujul või sobivas vehiikelis (nt maisiõli) lahustatuna; tahked ained tuleks võimaluse korral lahustada, kuna suured kogused ei pruugi želatiinikapslites täielikult absorbeeruda. Mitte-vesilahuseliste vehiikelite puhul peaksid olema teada vehiikeli toksilised omadused ning kui need ei ole teada, tuleks need enne katse läbiviimist kindlaks teha.

1.4.2. **Katsetingimused**

1.4.2.1. *Katseloomad*

Soovitatakse kasutada noori, 8–12 kuu vanuseid täiskasvanud munakanu *(Gallus gallus domesticus)*. Kasutada tuleks normaalsuuruses ja -aretusliini kanu ning kanad peaksid üldjuhul olema kasvatatud tingimuses, kus neil oli võimalik vabalt liikuda.

1.4.2.2. *Arv ja sugu*

Üldiselt tuleks kasutada kolme katserühma ja ühte vehiikeli võrdlusrühma. Võrdlusrühma, millele antakse vehiikelit, tuleks käsitada samal viisil kui katserühma, välja arvatud uuritava aine manustamise osas.

Igas lindude rühmas peab olema piisav arv kanu selleks, et biokeemiliste määramiste tegemiseks oleks võimalik tappa vähemalt kuus lindu (kolm lindu kahel eri ajahetkel) ja et kuus lindu jääksid ellu 14päevase vaatlusperioodi ajaks patoloogiauuringu tegemiseks.

1.4.2.3. *Annused*

Annuste valimisel tuleks arvesse võtta kolme viivistoimega neurotoksilisuse ägeda toksilisuse katse tulemusi ja teisi uuritava ühendi toksilisi või kineetilisi andmeid. Tuleks valida kõrgeim doositase, mille eesmärgiks oleks toksilise toime esilekutsumine, eelistatult viivistoimega neurotoksilisus, kuid vältida tuleks doositaset, mis kutsub esile surma või tõsised kannatused. Seejärel tuleks valida aste-astmelt vähenevad doositasemed doosist tuleneva reaktsiooni ja madalaimal doositasemel täheldatava kahjuliku toimeta doosi (NOAEL) demonstreerimiseks.

▼B

1.4.2.4. *Piirsisalduskatse*

Kui katses ei tuvastata käesolevas uuringus kirjeldatud menetlusega päevadoosil 1 000 mg kehakaalu kg kohta täheldatavat toksilist toimet ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga ainete osas saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta suurema doosiga uuringut vajalikuks. Teha võib piirsisalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese eeldatav kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

1.4.2.5. *Vaatlusperiood*

Kõiki loomi tuleks kokkupuuteperioodi ajal vaadelda vähemalt kord päevas ja pärast seda 14 päeva jooksul kuni kavandatava lahkamiseni.

1.4.3. **Katse käik**

Loomadele doseeritakse uuritavat ainet seitsmel päeval nädalas ja 28 päeva jooksul.

Üldised märkused

Vaatlused peaksid algama kohe pärast katse algust. Kõiki kanu tuleks põhjalikult vaadelda 28päevase katseaja jooksul vähemalt kord päevas ja seejärel 14 päeva jooksul pärast manustamist või kuni kavandatava tapmiseni. Kõik toksilisuse märgid tuleks üles märkida, sealhulgas ilmnemise aeg, liik, raskusaste ja kestus. Vaatluste käigus tuleks vaadelda lisaks muule kõrvalekaldeid käitumises. Ataksiat tuleks mõõta ordinaalse hindamisskaalaga, milles on vähemalt neli taset ja paralüüsi esinemine tuleks registreerida. Kanad tuleks vähemalt kaks korda nädalas puurist välja lasta ning neid tuleks väiksemate toksiliste mõjude hindamise hõlbustamiseks liikuma sundida (näiteks redelil ronimine). Haigestunud loomad, kellel esineb suurt stressi või valu, eemaldatakse katsest, tapetakse humaanselt ja lahatakse.

Kehakaal

Kõiki kanu tuleks kaaluda vahetult enne uuritava aine esmakordset manustamist ning seejärel iga nädala järel.

Biokeemia

Kuus juhuslikult valitud kana igast katserühmast ja võrdlusrühmast, millele antakse vehiikelit, tuleks tappa mõne päeva jooksul pärast viimase doosi manustamist ning ajust ja nimmelülidest valmistatud valmistist hinnatakse neuropaatia sihtesteraasi (NTE) pidurdamisaktiivsuse osas. Lisaks sellele tuleks ette valmistada ja analüüsida istmikunärvi kude neuropaatia sihtesteraasi (NTE) pidurdamisaktiivsuse osas. Tavaliselt tapetakse kolm võrdlusrühma ja katserühma kuuluvat lindu 24 tunni pärast ja kolm lindu pärast viimase doosi manustamist. Kui ägeda toksilisuse uuringute või muude uuringute (nt toksikokineetika) andmed osutavad sellele, et loomade tapmine peaks toimuma muul ajal kui pärast viimase doosi andmist, tuleks neid aegu järgida ning põhjendused dokumenteerida.

Vajaduse korral võib nende proovidega läbi viia ka atsetüülkoliinesteraasi analüüsi (AChE). AChE võib siiski spontaanselt in *vivo* reaktiveeruda ja tuua kaasa selle, et aine potentsiaali AChE inhibiitorina alahinnatakse.

▼B

Täielik lahang

Kõikide loomade (kelle tapmine oli kavatsetud ja kes olid suremas) täielik lahang peaks hõlmama aju ja seljaaju väliste tunnuste vaatlemist.

Histopatoloogiline uuring

Vaatlusperioodil ellujäänud ja biokeemilistes uuringutes kasutamata loomade närvikude tuleks mikroskoopiliselt uurida. Koed tuleks kinnitada kohapeal perfusiooni abil. Lõiked tuleks võtta väikeajust (keskmiselt pikitasandilt), piklikajust, seljaajust ja perifeersetest närvidest. Seljaaju puhul tuleb lõiked võtta ülemistest kaelalülidest, kesktorakaalosast ja lumbosakraalosast. Tuleks võtta lõiked ka tibiaalnärvi distaalsest osast ja selle kaksiksääre-marjalihase harudest ja istmikunärvist. Lõiked tuleks katta sobivate müeliini- ja aksonispetsiifiliste ainetega. Alguses tuleks kõikide võrdlusrühma ja kõrge doosiga rühmade loomade säilitatud kudesid mikroskoopiliselt uurida. Kui kõrge doosiga rühmade puhul on toime kohta tõendid olemas, tuleks mikroskoopiline uuring viia läbi ka keskmise ja madala doosiga rühmade puhul.

2. **ANDMED**

Käesolevas meetodis valitud lõpp-punktide (biokeemia, histopatoloogia ja käitumuslik vaatlus) negatiivsed tulemused ei nõua tavapäraselt täiendavat uurimist viivistoimega neurotoksilisuse osas. Nendes lõpp-punktides saadud ebaselged või poolikud tulemused võivad nõuda täiendavat hindamist.

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Kõik andmed tuleks esitada kokkuvõtvalt tabelis, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, vigastustega loomade arv, toime käitumisele või biokeemiline toime, kahjustuste või toime liik ja raskusaste, loomade protsent iga tüüpi vigastuste ja raskusastmete kohta.

Käesoleva uuringu tulemusi tuleks hinnata käitumuslike, biokeemiliste ja histopatoloogiliste mõjude esinemise, raskusastme ja korrelatsiooni põhjal ja katse või võrdlusrühmas täheldatud muude mõjude suhtes.

Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata asjakohaste ja üldiselt tunnustatud statistiliste meetoditega. Statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet.

Katseloomad:

— kasutatud aretusliin;

— loomade arv ja vanus;

— päritolu, pidamistingimused, toit jne;

— iga looma kaal katse alguses.

▼B

Katsetingimused:

— uuritava aine ettevalmistamise, stabiilsuse ja homogeensuse üksikasjad, kui see on asjakohane;

— vehiikeli valiku põhjendus;

— uuritava aine manustamise üksikasjad;

— toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— doosi valimise põhjendused;

— manustatud dooside üksikasjad, sealhulgas andmed vehiikeli, mahu ja manustatud aine füüsilise vormi kohta;

— teiste biokeemiliste määramiste aegade valimise põhjendus, kui selleks ei ole 24 või 48 tundi.

Tulemused:

— kehakaalu andmed;

— toksilise reaktsiooni andmed vastavalt doositasemele, sealhulgas suremus;

— täheldatava kahjuliku toimeta doos;

— kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);

— biokeemiliste meetodite ja leidude üksikasjalik kirjeldus;

— lahkamise tulemused;

— histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste üle arutlemine.

Järeldused.

4. **VIITED**

Käesolev meetod on analoogne meetodiga OECD TG 419.

▼B

B.39. PLAANIVÄLISE DNA SÜNTEESI (UDS) KATSE IMETAJATE MAKSARAKKUDEGA *IN VIVO*

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Plaanivälise DNA sünteesi (UDS) katse imetajate maksarakkudega *in vivo* eesmärk on identifitseerida katseained, mis põhjustavad DNA parandust katseloomade maksarakkudes (1, 2, 3, 4).

Käesolev *in vivo* katse on meetod keemiliste ainete genotoksiliste mõjude uurimiseks maksas. Mõõdetud lõpp-punkt ilmneb DNA kahjustuses ja selle hilisemas parandamises maksarakkudes. Maks on tavaliselt imendunud ühendite ainevahetuse peamine koht. See on seega sobiv koht DNA kahjustuse mõõtmiseks *in vivo*.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav aine ei pääse sihtkoesse, siis ei ole vaja kasutada käesolevat katset.

Plaanivälise DNA sünteesi (UDS) lõpp-punkt mõõdetakse määrates märgistatud nukleosiidide ühinemist S-faasi DNA sünteesi väliste rakkudega. Enimkasutatav meetod on triitiumiga märgistatud tümidiini (^{3}H-TdR) ühinemise määramine autoradiograafiliselt. *In vivo* UDS-katsetes kasutatakse eelistatult rotimaksasid. Võib kasutada ka muid kudesid peale maksa, kuid neid ei kirjeldata käesolevas meetodis.

UDS-vastuse avastamine sõltub väljalõigatud ja asendatud DNA aluste arvust kahjustuse kohas. Seega on UDS-katse eriti väärtuslik ainetest põhjustatud „pikkade DNA osade paranduse” (*longpatch repair*) avastamiseks (20–30 alust). „Lühikeste osade parandus” (*shortpatch repair*) (1–3 alust) avastatakse palju väiksema tundlikkusega. Lisaks võivad mutageensed muutused aset leida DNA kahjustuste parandamata jätmisel, parandamisvigade või replikatsioonivigade tegemisel. UDS-vastuse ulatus ei viita parandusprotsessi usaldusväärsusele. Lisaks on võimalik, et mutageen reageerib DNAga, aga DNA kahjustust ei parandata lõikamis-parandamisprotsessi kaudu. Kuna lõpp-punkt mõõdetakse kogu genoomist, siis potentsiaalne tundlikkus korvab selle, et UDS-katse ei anna spetsiifilist teavet mutageense aktiivsuse kohta.

Vt ka B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Parandatavad rakud – osakeste netoarv tuumas ehk NNG-väärtus on suurem kui arvestuslik väärtus, mida on põhjendatud katset tegevas laboris.

NNG-väärtus (*net nuclear grains*) – rakkude UDS-aktiivsuse kvantitatiivne mõõtmine autoradiograafilistes UDS-katsetes, arvutatuna tuumale vastavatel tsütoplasma aladel (CG) tsütoplasma osakeste keskmise arvu mahaarvamisel tuumaosakeste arvust (NG): NNG = NG – CG. NNG-arvud arvutatakse üksikute rakkude kohta ja seejärel pannakse rakud kultuuris, paralleelsetes kultuurides jm kokku.

▼B

Plaaniväline DNA süntees (UDS) – DNA parandussüntees pärast seda, kui keemiliste ainete või füüsikaliste mõjurite põhjustatud kahjustuse alal sisalduva DNA osa on lahti lõigatud ja eemaldatud kromosoomist.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

UDS-katse imetajate maksarakkudega *in vivo* viitab DNA parandussünteesile pärast seda, kui keemiliste ainete või füüsikaliste mõjurite põhjustatud kahjustuse alal sisalduva DNA osa on lahti lõigatud ja eemaldatud kromosoomist. Katse põhineb enamasti ^{3}H-TdR lisamisel maksarakkude DNA-sse, millel on üksnes väike rakutsükli S-faasis olevate rakkude esinemissagedus. ^{3}H-TdR lisamine määratakse tavaliselt autoradiograafiliselt, kuna kõnealune tehnika ei ole vastuvõtlik S-faasis olevatele rakkudele, nagu nt vedeliktsintsillatsiooniloendus.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Preparaadid**

1.4.1.1. *Loomaliikide valik*

Tavaliselt kasutatakse rotte, kuigi võib kasutada mis tahes sobivaid imetajate liike. Rakendatakse noorte tervete loomade enimkasutatavaid laboritüvesid. Uuringut alustades peaks loomade kaalumuutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada ± 20 % iga soo keskmisest kaalust.

1.4.1.2. *Elamis- ja söötmistingimused*

Üldise sissejuhatuse B osas toodud üldtingimusi kohaldatakse, kuigi niiskuse eesmärk peaks olema 50–60 %.

1.4.1.3. *Loomade ettevalmistamine*

Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt ja hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne uurimuse alustamist, et võimaldada labori tingimustega kohanemist.

1.4.1.4. *Uuritav aine/preparaat*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajadusel lahjendada enne loomadele andmist. Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida vahetult või lahjendatakse enne doseerimist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**

1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate annuste korral ja ei tohi astuda keemilise reaktsiooni uuritava ainega. Kui kasutatakse muud kui tuntud lahustit/kandjaainet, peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahustite/-kandjaainete kasutamist.

▼B

1.4.2.2. *Kontrollid*

Igasse sõltumatult läbiviidud katseossa kaasatakse paralleelsed positiivsed ja negatiivsed (lahusti/kandjaaine) kontrollid. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neid ei töödelda uuritava ainega.

Positiivsed kontrollid peaksid olema ained, mis teatavasti põhjustavad UDS-i, kui neid antakse annustena, mis ootuspäraselt põhjustavad avastatavat suurenemist taustaga võrreldes. Metaboolset aktiveerimist vajavaid positiivseid kontrolle tuleks kasutada annustena, mis annavad mõõduka vastuse (4). Annused valitakse nii, et mõjud on selged, kuid need ei paljasta lugejale koheselt kodeeritud objektiklaaside identiteeti. Positiivsete kontrollainete näited:

Proovivõtuaeg	Aine	CASi nr	EINECSi nr
Varane proovivõtuaeg (2–4 tundi)	Dimetüülnitrosoamiin	62-75-9	200-249-8
Hiline proovivõtuaeg (12–16 tundi)	N-2-atsetamiidfluor (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Võidakse kasutada muid sobivaid positiivseid kontrollaineid. Positiivseid kontrollaineid võib manustada uuritavast ainest erineva manustamistee kaudu.

1.5. MENETLUS

1.5.1. **Loomade arv ja sugu**

Katseloomade arv peaks olema piisav katsevastuses loodusliku bioloogilise varieerumise arvessevõtmiseks. Analüüsitavaid loomi peaks olema vähemalt kolm rühma kohta. Kui märkimisväärne andmebaas on kogutud juba varem, paralleelsete negatiivsete või positiivsete kontrollrühmade jaoks on vaja üksnes üks või kaks looma.

Üksnes üht sugupoolt, eelistatult isasloomasid, võidakse kasutada, kui uurimuse ajal on kättesaadavad tulemused samas liigis ja sama vastuvõtlikkuse liini kasutades tehtud uurimuste kohta, mille tulemused näitavad, et toksilisuse osas ei ole märkimisväärseid erinevusi sugupoolte vahel. Kui inimese vastuvõtlikkus kemikaalidele on soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse sobivast soost loomadega.

1.5.2. **Manustamiskava**

Uuritavaid ained tuleb üldiselt anda ühekordse annusena.

1.5.3. **Annused**

Normaalselt kasutatakse vähemalt kaht erinevat annust. Suurim annus määratletakse annusena, mis põhjustab sarnaseid mürgisusenähte, et samale manustamiskavale põhinevate suuremate annuste puhul võib tulemuseks olla surm. Üldiselt peaksid väiksemad annused olema 50–25 % suurest annusest.

▼B

Ained, millel on spetsiifilised bioloogilised mõjud väikeste mittetoksiliste annustena (nt hormoonid ja mitogeenid), võivad olla erandiks annuse määramise kriteeriumidele ja neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Kui tehakse annuse määramiseks uurimus sobivate andmete puudumisel, siis tehakse uurimus samas laboris, kasutades samu liike, tüvesid, sugu ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuurimuses.

Suurim annus võidakse samuti määratleda annusena, mis viitab toksilisusele maksas (nt püknootiline tuum).

1.5.4. **Piirsisalduskatse**

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 2 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas ja mida manustatakse ühekordse annusena või kahe annusena samal päeval, ei põhjusta täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui genotoksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt seotud ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uurimust vajalikuks. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutavatest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele.

1.5.5. **Manustamine**

Uuritavat ainet manustatakse tavaliselt söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil. Samuti võib muid manustamisteid kasutada, kui need on põhjendatud. Kõhukelmesisest teed siiski ei soovitata, kuna maks on sel juhul uuritavale ainele vahetult vastuvõtlikum kui vereringe kaudu. Vedeliku suurim kogus, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus ei tohiks ületada 2 ml/100 g kehakaalu kohta. Suurimate koguste kasutamine peab olema põhjendatud. Arvesse võtmata ärritavaid või söövitavaid aineid, mille mõjud tavaliselt halvenevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katsekoguse varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

1.5.6. **Maksarakkude preparaadid**

Maksarakud prepareeritakse uuritavat ainet saanud loomadelt tavaliselt 12–16 tundi pärast annustamist. Täiendav varasem proovivõtuaeg (tavaliselt kaks kuni neli tundi manustamisjärgselt) on üldiselt vajalik, välja arvatud juhul, kui on saadud selge positiivne vastus 12–16 tunni jooksul. Muid proovivõtuaegasid võib kasutada, kui need on põhjendatud toksokineetiliste andmete põhjal.

Imetajate maksarakkude lühiajalised kultuurid tehakse tavaliselt selleks, et perforeerida maksa kollagenaa-siga in situ ja võimaldada värskelt eraldunud maksarakkudel end kinnitada sobivale pinnasele. Negatiivsetelt kontroll-loomadelt pärit maksarakkudel peaks olema elujõulisus (5) vähemalt 50 %.

1.5.7. **UDS-määramine**

Värskelt isoleeritud imetajate maksarakud inkubeeritakse tavaliselt keskkonnas, mis sisaldab ^{3}H-TdR-i, sobiva pikkusega aja jooksul, nt kolm kuni kaheksa tundi. Inkubatsiooniperioodi lõpus tuleks sööde eraldada rakkudest, mida võidakse seejärel inkubeerida söötmes, mis sisaldab liiga palju märgistamata tümidiini inkorporeerimata radioaktiivsuse vähendamiseks *(cold chase)*. Seejärel rakud loputatakse, fikseeritakse ja kuivatatakse. Pikema inkubatsiooniaja jooksul ei pruugi märgistamata tümidiiniga töötlemine olla vajalik. Objektiklaasid kastetakse autoradiograafilise emulsiooni sisse, valgustatakse pimedas (säilitatakse külmkapis 7–14 päeva), ilmutatakse, värvitakse ning arvutatakse valgustatud hõbeosakesed. Kaks kuni kolm objektiklaasi valmistatakse iga looma kohta.

▼B

1.5.8. **Analüüs**

Objektiklaasi preparaadid peaksid sisaldama piisavalt rakke, mille morfoloogia on normaalne, milles võimaldatakse teha UDSi tähendusrikast hindamist. Preparaate uuritakse mikroskoopiliselt ilmsete tsütotoksiliste tunnuste suhtes (nt püknoos, radiomärgistuse vähenemine).

Objektiklaasid kodeeritakse enne osakeste kokkulugemist. Tavaliselt igast loomast loetletakse 100 rakku vähemalt kahelt objektiklaasilt. Vähem kui 100 rakku/loom loendamine peab olema põhjendatud. Osakeste arvu ei arvutata S-faasis olevast tuumast, kuid S-faasi rakkude osa registreeritakse.

Morfoloogiliselt normaalsete rakkude tuuma ja tsütoplasmasse inkorporeeritud ^{3}H-TdR hulk, mida nähakse hõbeosakeste sadestumisel, määratakse sobivate meetodite abil.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Tuleb esitada individuaalsed objektiklaasi ja loomade andmed. Lisaks esitatakse kokkuvõte kõikidest tulemustest tabeli kujul. NNG-arvud arvutatakse iga raku, iga looma, iga annuse ja aja kohta CG-arvude mahaarvamisel NG-arvudest. Kui arvutatakse „parandatavate rakkude” arvu, peaks „parandatavate rakkude” määratlemine olema põhjendatud ja põhinema varasemate ja paralleelsete negatiivsete kontrollide andmetel. Numbrilisi tulemusi hinnatakse statistiliste meetodite abil. Kui statistilisi katseid kasutatakse, valitakse ja põhjendatakse neid enne uurimuse läbiviimist.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivsete/negatiivsete vastuste kriteeriumide näited hõlmavad:

positiivne	i)	NNG-väärtused on suuremad kui arvestuslik lävi, mis on õigustatud varasemate laboriandmete põhjal;
või	ii)	NNG väärtused on oluliselt suuremad kui paralleelsetes kontrollkatsetes;
negatiivne	i)	NNG väärtused on varasema kontroll-läve piires või sellest väiksemad;
või	ii)	NNG väärtused ei ole oluliselt suuremad kui paralleelsetes kontrollkatsetes.

▼B

Tulemuste bioloogilist olulisust arutatakse: nt loomade väliste varieerumiste, doosi ja toime suhte ja tsütotoksilisuse parameetreid tuleks arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel. Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse saamiseks.

Kuigi enamikul katsetest on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete kordamisest sõltumata.

UDS-katse imetajate maksarakkudega *in vivo* positiivne tulemus viitab sellele, et uuritav aine põhjustab DNA kahjustuse imetajate maksarakkudes *in vivo,* mida saab parandada plaanivälise DNA sünteesi *in vitro* abil. Negatiivne tulemus viitab sellele, et uuritav aine ei põhjusta katsetingimustes DNA kahjustust, mis oleks käesolevas katses avastatav.

Tõenäosust, et uuritav aine jõuab üldisesse vereringesse või eriti sihtkoesse (nt süsteemne toksilisus), tuleks arutada.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab järgmisi andmeid.

Kandjaaine:

— kandjaaine valiku põhjendamine;

— uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, elamistingimused, toitumine jne;

— loomade individuaalne kaal katse alustamisel, sh kehakaalu vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta;

Katsetingimused:

— positiivsed ja negatiivsed (kandjaaine/lahus) kontrollid;

— annuse määramise katse tulemused, kui need on läbi viidud;

— annuste valiku põhimõtted;

— uuritava aine ettevalmistamise üksikasjad;

— uuritava aine manustamise üksikasjad;

— manustamistee;

— meetodid, mis kinnitavad, et uuritav aine jõuab üldvereringesse või sihtkoesse, vajaduse korral;

▼B

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kg kehakaalu kohta päevas), vajaduse korral;

— üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta;

— manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus;

— toksilisuse mõõtmise meetodid;

— maksarakkude preparaatide ja kultuuride valmistamise meetod;

— kasutatud autoradiograafiline tehnika;

— prepareeritud objektiklaaside arv ja loendatud rakkude arv;

— hindamiskriteeriumid;

— kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

— tuumas olevate osakeste, tsütoplasmas olevate osakeste ja osakeste koguarvu tuumas keskväärtused üksikute objektiklaaside, loomade ja rühma kohta;

— doosi ja toime suhe, võimaluse korral;

— võimalikud statistilised analüüsid;

— toksilisuse tunnused;

— paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide tulemused;

— varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;

— „parandatavate rakkude” arv, kui see on määratud;

— S-faasi rakkude arv, kui see on määratud;

— rakkude elujõulisus.

Tulemuste arutelu.

Järeldused

4. **VIITED**

(1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat. Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 189, pp. 123-133.

(3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla. G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, Mutation Res., 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepalocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553-562.

▼M8

B.40. *IN VITRO* NAHASÖÖVITUS: TRANSKUTAANSE ELEKTRITAKISTUSE (TET) MÕÕTMISEL PÕHINEV KATSEMEETOD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 430 (2015). Nahasöövituse all mõistetakse läbi marrasknaha pärisnahani ulatuva nähtava nekroosina avalduva pöördumatu nahakahjustuse tekkimist pärast uuritava kemikaaliga töötlemist, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1) ning Euroopa Liidu (EL) määruses nr 1272/2008, milles käsitletakse ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (edaspidi „CLP-määrus“) ([1]). Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi B.40 näol on tegemist *in vitro* meetodiga, mis võimaldab tuvastada mittesöövitavaid ja söövitavaid aineid ja segusid kooskõlas ÜRO GHSi (1) ja CLP-määrusega.

2. Nahasöövituse hindamisel on tavapäraselt kasutatud laboriloomi (katsemeetod B.4, mis on samaväärne algselt 1981. aastal vastu võetud ning aastatel 1992, 2002 ja 2015 muudetud OECD katsejuhendiga nr 404) (2). Peale käesoleva katsemeetodi B.40 on valideeritud ja vastu võetud muudki *in vitro* katsemeetodid kemikaalide võimaliku nahka söövitava toime tuvastamiseks – näiteks katsemeetodid B.40b (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 431) (3) ja B.65 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435) (4), mis võimaldavad vajaduse korral teha kindlaks ka söövitava kemikaali alamkategooria. Samuti on katsemeetodi B.46 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 439) (5) raames vastu võetud mitu valideeritud *in vitro* katsemeetodit nahaärrituse hindamiseks. OECD juhenddokumendis nahasöövituse ja -ärrituse puhul kasutatava katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta kirjeldatakse mitut moodulit, milles eri teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (6).

3. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimtervisega seotud lõppnäitajana nahasöövitust. Meetod põhineb roti naha transkutaanse elektritakistuse (TET) mõõtmisel ning selle puhul kasutatakse nahakettaid, mille abil tehakse kindlaks söövitavad ained selle järgi, kas need on võimelised kahjustama normaalse sarvkihi terviklikkust ja selle toimimist kaitsekihina. Vastav OECD katsejuhend võeti algselt vastu 2004. aastal ja seda ajakohastati 2015. aastal, et lisada viide eespool nimetatud juhenddokumendile katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta.

4. *In vitro* nahasöövituse tuvastamise metoodika hindamiseks regulatiivsel eesmärgil viidi läbi valideerimiseelsed uuringud (7) ja seejärel roti naha TET mõõtmisel põhineva, nahasöövituse hindamiseks kasutatava katsemeetodi ametlik valideerimisuuring (8, 9, 10, 11). Nende uuringute tulemusena

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼**M8**

esitati soovitus, et kõnealust TET mõõtmisel põhinevat katsemeetodit, mis on määratud valideeritud standardmeetodiks (VSM), võiks kasutada regulatiivsel eesmärgil *in vivo* nahasöövituse hindamiseks (12, 13, 14).

5. Enne kui regulatiivsel eesmärgil nahasöövituse hindamiseks saab VSMi kõrval kasutada mõnda muud TET mõõtmisel põhinevat soovitud sarnast või muudetud *in vitro* katsemeetodit, tuleks teha kindlaks sellise meetodi usaldusväärsus, asjakohasus (täpsus) ja piirangud kavandatava kasutusotstarbe puhul, et tagada selle sarnasus VSMiga kooskõlas tulemuslikkuse standardites sätestatud nõuetega (15). OECD otsuse kohane andmete vastastikune tunnustamine on tagatud üksnes pärast seda, kui tulemuslikkuse standarditele vastav mis tahes välja pakutud uus või ajakohastatud katsemeetod on läbi vaadatud ja asjaomasesse OECD katsejuhendisse lisatud.

MÕISTED

6. Kasutatud mõisted on määratletud liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Valideerimisuuringu (10) ja muude avaldatud uuringute (16, 17) andmeil võimaldab roti naha TET mõõtmisel põhinev katsemeetod eristada 122 ainet sisaldavas andmebaasis esindatud teadaolevaid nahka söövitavaid aineid mittesöövitavatest ainetest üldise tundlikkusega 94 % (51/54) ja spetsiifilisusega 71 % (48/68).

8. Käesolevas katsemeetodis käsitletakse *in vitro* nahasöövitust. Meetod võimaldab teha kooskõlas ÜRO GHSi / CLP-määrusega kindlaks mittesöövitavad ja söövitavad uuritavad kemikaalid. Nagu nähtub valideerimisuuringutest (8, 9, 10, 11), piirab selle katsemeetodi kasutamist asjaolu, et see ei võimalda liigitada söövitavaid aineid ja segusid ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastesse alamkategooriatesse. Käesoleva katsemeetodi kasutusviis määratakse kindlaks kohaldatava õigusraamistikuga. Ehkki käesolev katsemeetod ei võimalda saada piisavat teavet nahaärrituse kohta, tuleks tähele panna, et tervisemõjuna hinnatavat *in vitro* nahaärritust käsitletakse konkreetselt katsemeetodis B.46 (5). Ühekordse nahakaudse kokkupuute järel nahale avalduva lokaalse toime täielikku hindamist on kirjeldatud OECD juhenddokumendis katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (6).

9. Käesoleva katsemeetodi valideerimiseks uuriti paljusid eri kemikaale, peamiselt aineid; valideerimisuuringu empiirilises andmebaasis on 60 ainet paljudest eri kemikaaliklassidest (8, 9). Kokkuvõetuna nähtub olemasolevatest andmetest, et katsemeetod on kasutatav paljude eri kemikaaliklasside ja eri füüsikalises olekus ainete, sealhulgas vedelike, pooltahkete ja tahkete ainete ning vahade puhul. Tuleks märkida, et kuna teatud kindlate füüsikaliste olekute puhul ei ole sobivate võrdlusandmetega katseained hõlpsalt kättesaadavad, on valideerimise käigus hinnatud suhteliselt väikest arvu vahasid ja tahkeid söövitavaid aineid. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria ainete puhul kasutada, tuleks hoiduda selle kasutamisest sellise kategooria ainete puhul. Peale selle saab käesolevat katsemeetodit ainete kõrval eeldatavalt kasutada ka segude puhul. Ent kuna segud kuuluvad paljudesse eri kategooriatesse ja on eri koostisega ning nende kasutamise kohta katses on praegu piiratud hulgal teavet, tuleks juhul, kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria segude puhul kasutada (nt strateegia abil, mille on 2012. aastal välja pakkunud Eskes *et al.*) (18), hoiduda selle kasutamisest sellise kategooria segude puhul. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile

▼M8

vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud. Gaase ja aerosoole ei ole valideerimisuuringutes veel hinnatud (8, 9). Ehkki on võimalik, et neidki saab uurida TET mõõtmisel põhineva katsemeetodiga, ei võimalda praegune katsemeetod gaaside ega aerosoolide uurimist.

KATSE PÕHIMÕTE

10. Uuritav aine kantakse kuni 24 tunniks nahaketaste marrasknahale kahekambrilises katsesüsteemis, milles nahakettad toimivad kambritevahelise eralduskihina. Nahakettad võetakse humaanselt surmatud 28–30 päeva vanustelt rottidelt. Söövitavad kemikaalid tehakse kindlaks nende võime järgi kahjustada normaalse sarvkihi terviklikkust ja selle toimimist kaitsekihina; see ilmneb mõõdetud TET vähenemisena allapoole läviväärtust (16) (vt punkt 32). Roti naha TET läviväärtuseks on valitud 5 kΩ; selle väärtuse valimisel on lähtutud suurest hulgast andmetest paljude eri ainete kohta, millest valdava enamiku puhul on TET väärtus nimetatud väärtusest selgelt suurem (sageli > 10 kΩ) või selgelt väiksem (sageli < 3 kΩ) (16). Üldjuhul ei põhjusta uuritavad kemikaalid, mis on loomadele mittesöövitavad ning kas ärritavad või mitteärritavad, TET vähenemist kõnealusest läviväärtusest allapoole. Muude nahapreparaatide või seadmete kasutamine võib aga tingida selle läviväärtuse muutmise ning sel juhul on vajalik täiendav valideerimine.

11. Käesolev katsemeetod hõlmab värvaine sidumise etappi, et võimaldada katseliselt kinnitada TET mõõtmisel saadud positiivseid tulemusi, sealhulgas juhul, kui saadud väärtus jääb 5 kΩ lähedusse. Värvaine sidumise etapis tehakse kindlaks, kas ioonilise läbitavuse suurenemine on tingitud sarvkihi füüsilisest hävimisest. On tõendatud, et roti naha TET mõõtmisel põhineva meetodiga saab prognoosida katsemeetodi B.4 abil hinnatavat *in vivo* söövitavat toimet küülikul (2).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

12. Enne käesolevale katsemeetodile vastava, roti naha TET mõõtmisel põhineva katsemeetodi regulaarset kasutamist tuleks labori tehnilise pädevuse tõendamiseks õigesti liigitada kaksteist tabelis 1 loetletud soovitatavat pädevusainet. Kui mõni loetletud ainetest ei ole kättesaadav või kui see on põhjendatav, võib kasutada mõnda muud ainet, mille kohta on olemas piisavad *in vivo* ja *in vitro* võrdlusandmed (nt võrdluskemikaalide loetelust (16) valitud ainet), ent üksnes juhul, kui kohaldatakse samu valikukriteeriume, nagu on kirjeldatud tabelis 1.

Tabel 1

Pädevusainete loetelu ([1])

Aine	CASi nr	Kemikaaliklass ([2])	ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane *in vivo* tulemustel põhinev kategooria ([3])	VSMga saadud *in vitro* tulemustel põhinev kategooria	Füüsikaline olek	pH ([4])
In vivo söövitavad ained						
N,N'-dimetüüldipropüleentriamiin	10563-29-8	Orgaaniline alus	1A	6 × S	V	8,3
1,2-diaminopropaan	78-90-0	Orgaaniline alus	1A	6 × S	V	8,3

▼**M8**

Aine	CASi nr	Kemikaaliklass ([2])	ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane *in vivo* tulemustel põhinev kategooria ([3])	VSMga saadud *in vitro* tulemustel põhinev kategooria	Füüsikaline olek	pH ([4])
In vivo söövitavad ained						
Väävelhape (10 %)	7664-93-9	Anorgaaniline hape	(1A/)1B/1C	5 × S 1 × MS	V	1,2
Kaaliumhüdroksiid (10 % vesilahus)	1310-58-3	Anorgaaniline alus	(1A/)1B/1C	6 × S	V	13,2
Oktaanhape (kaprüülhape)	124-07-2	Orgaaniline hape	1B/1C	4 × S 2 × MS	V	3,6
2-*tert*-butüülfenool	88-18-6	Fenool	1B/1C	4 × S 2 × MS	V	3,9
In vivo mittesöövitavad ained						
Isostearhape	2724-58-5	Orgaaniline hape	MS	6 × MS	V	3,6
4-amino-1,2,4-triasool	584-13-4	Orgaaniline alus	MS	6 × MS	T	5,5
Fenetüülbromiid	103-63-9	Elektrofiil	MS	6 × MS	V	3,6
4-(metüültio)bensaldehüüd	3446-89-7	Elektrofiil	MS	6 × MS	V	6,8
1,9-dekadieen	1647-16-1	Neutraalne orgaaniline aine	MS	6 × MS	V	3,9
Tetrakloroetüleen	127-18-4	Neutraalne orgaaniline aine	MS	6 × MS	V	4,5

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber; MS – mittesöövitav; S – söövitav; T – tahkis; V – vedelik; VSM – valideeritud standardmeetod.

([1]) Need pädevusained, mis on järjestatud esmalt nii, et söövitavad ained on esitatud enne mittesöövitavaid aineid, ning seejärel söövitavuse alamkategooria ja edasi kemikaaliklassi järgi, on valitud ainete hulgast, mida kasutati Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Euroopa Keskuse (ECVAM) uuringus roti naha TET-l põhineva katsemeetodi valideerimiseks (8, 9). Kui ei ole teisiti märgitud, uuriti kõnealuseid aineid sellise puhtusastme juures, nagu need kaubanduslikust allikast osteti (8). Ainete valimisel lähtuti võimalikult suurel määral sellest, et: i) need oleksid VSMi abil mõõdetava või ennustatava eri söövitavusega (nt mittesöövitavad, nõrgalt söövitavad ja tugevalt söövitavad ained), ii) need esindaksid valideerimisuuringus kasutatud kemikaaliklasse, iii) VSMi tulemuslikkuse näitajad oleksid arvesse võetud, iv) ainetel oleks täpselt määratletud keemiline struktuur, v) need võimaldaksid saada standardse *in vivo* katsemeetodiga selgepiirilisi tulemusi, vi) need oleksid turul kättesaadavad ning vii) nende kõrvaldamise kulud ei oleks liiga suured.

([2]) Kemikaaliklass, mille on kindlaks määranud Barratt *et al.* (8).

([3]) ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastele 1A, 1B ja 1C kategooriatele vastavad ÜRO I, II ja III pakendirühm.

([4]) Need pH väärtused on avaldanud Fentem *et al.* (9) ja Barratt *et al.* (8).

▼M8

KATSE KÄIK

13. Standardne töökord roti naha TET-l põhineva, nahasöövituse hindamist võimaldava katsemeetodi rakendamiseks on leitav kirjandusest (19). Käesoleva katsemeetodi kohases roti naha TET mõõtmise katses peaksid olema täidetud järgmised tingimused.

Loomad

14. Tuleks kasutada rotte, sest nende naha tundlikkus ainetele käesoleva katsemeetodi kasutamisel on juba tõendatud (12) ning tegemist on ainsa nahaallikaga, mis on ametlikult valideeritud (8, 9). Väga oluline on roti vanus (naha võtmise hetkel) ja päritoluliin, kuna tuleks tagada, et karvanääpsud on uinuvas olekus ja täiskasvanud looma karvakasv ei ole veel alanud.

15. Noorte, umbes 22 päeva vanuste (Wistari või sellega võrreldavast liinist pärit) emas- või isasrottide selja- ja küljekarv eemaldatakse hoolikalt väikeste kääridega. Seejärel pestakse loomi hoolikalt pühkimise teel ning pügatud piirkond kastetakse üleni antibiootikumilahusesse (mis sisaldab näiteks streptomütsiini, penitsilliini, klooramfenikooli ja amfoteritsiini kontsentratsioonis, mille juures bakterite kasv on pärsitud). Loomi pestakse antibiootikumidega uuesti kolmandal või neljandal päeval pärast esimest pesu ning kasutatakse kolme päeva jooksul pärast teist pesu, kui sarvkiht on karvade eemaldamisest taastunud.

Nahaketaste ettevalmistamine

16. Loomad surmatakse humaanselt 28–30 päeva vanuses; see vanus on väga oluline. Seejärel eemaldatakse iga looma selja- ja küljenahk ning tõmmatakse sellelt ettevaatlikult maha liigne nahaalune rasvakiht. Lõigatakse välja nahakettad läbimõõduga umbes 20 mm. Nahka võib enne ketaste kasutamist säilitada, kui on tõendatud, et sellise naha puhul positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud tulemused on samaväärsed värske naha kasutamisel saadud tulemustega.

17. Iga nahaketas asetatakse polütetrafluoroetüleentoru (PTFE-toru) ühele otsale nii, et marrasknaha pind on toruga kontaktis. Toru otsa surutakse naha paigal hoidmiseks kummist rõngastihend ja liigne kude lõigatakse ära. Seejärel tihendatakse kummist rõngastihendi ja PTFE-toru ühenduskoht hoolikalt vaseliiniga. Toru asetatakse vastuvõtunõusse, mis sisaldab $MgSO_4$ lahust (154 mM), ja kinnitatakse vedruklambriga (joonis 1). Nahaketas peaks jääma üleni $MgSO_4$ lahusesse. Ühe roti nahast võib saada 10–15 nahaketast. Toru ja rõngastihendi mõõtmed on esitatud joonisel 2.

18. Enne katse algust mõõdetakse iga looma naha kvaliteedi kontrollimiseks kahe nahaketta transkutaanne elektritakistus. Kummagi ketta elektritakistus peaks olema suurem kui 10 kΩ, et ülejäänud kettaid oleks võimalik katses kasutada. Kui takistus on väiksem kui 10 kΩ, tuleks kõik ülejäänud sellest nahast saadud kettad ära visata.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainetega töötlemine

19. Katsemudeli piisava töökindluse tõendamiseks tuleks igas mõõtmistsüklis (katses) kasutada paralleelset positiivset ja negatiivset kontrolli. Igas eraldi mõõtmistsüklis (katses) tuleks kasutada ühelt ja samalt loomalt saadud nahakettaid. Soovitatavad positiivse ja negatiivse kontrolli ained on vastavalt 10 M soolhape ja destilleeritud vesi.

▼M8

20. Vedelad uuritavad kemikaalid (150 µl) kantakse ühtlaselt toru sees olevale marrasknahale. Tahke aine uurimisel kantakse see ühtlaselt nahakettale piisavas koguses, et kogu marrasknaha pind saaks kaetud. Tahkele ainele lisatakse deioniseeritud vett (150 µl) ja toru loksutatakse ettevaatlikult. Nahaga maksimaalse kontakti saavutamiseks võib olla vaja uuritavat tahket kemikaali sulatamiseks või pehmendamiseks kuni 30 °C-ni soojendada või seda teralise materjali või pulbri saamiseks peenestada.

21. Iga uuritava kemikaali ja kontrollaine jaoks kasutatakse igas mõõtmistsüklis (katses) kolme nahaketast. Uuritavat kemikaali hoitakse temperatuuril 20–23 °C nahaga kontaktis 24 tundi. Seejärel pestakse nahka uuritava kemikaali eemaldamiseks toatemperatuuril oleva või jahedama kraanivee joaga, kuni materjali enam ei eraldu.

TET mõõtmine

22. Naha impedantsi määramiseks mõõdetakse TETd madalpingel töötava Wheatstone'i vahelduvvoolusilla abil (18). Mõõtesilla üldised tehnilised näitajad on järgmised: tööpinge 1–3 V, siinus- või ristkülikvahelduvvool sagedusega 50–1 000 Hz ja mõõtepiirkond vähemalt 0,1–30 kΩ. Valideerimisuuringus kasutatud mõõtesillaga mõõdeti sagedusel 100 Hz või 1 kHz induktiivsust, mahtuvust ja takistust väärtuseni vastavalt 2 000 H, 2 000 µF või 2 MΩ; seejuures kasutati jada- või rööpühenduse puhul saadud näitusid. TET-põhises söövitavuskatses mõõdetakse takistust sagedusel 100 Hz ning kasutatakse jadaühenduse puhul saadud näitusid. Enne elektritakistuse mõõtmist lisatakse naha pindpinevuse vähendamiseks 70-protsendilist etanooli koguses, millest piisab marrasknaha katmiseks. Mõne sekundi pärast eemaldatakse etanool torust ja koe niisutamiseks lisatakse 3 ml $MgSO_4$ lahust (154 mM). Nahakettast kummalegi poole paigutatakse mõõtesilla elektroodid, et mõõta nahaketta takistust kilo-oomides (joonis 1). Elektroodide mõõtmed ja hammasklambrist allapoole ulatuva elektroodiosa pikkus on esitatud joonisel 2. Sisemisele elektroodile kinnitatav klamber toetatakse takistuse mõõtmise ajaks PTFE-toru otsale, et elektrood ulatuks alati samas pikkuses $MgSO_4$ lahusesse. Välimine elektrood paigutatakse vastuvõtunõusse nii, et see toetub nõu põhjale. Vedruklambri ja PTFE-toru põhja vahelist kaugust hoitakse konstantsena (joonis 2), sest see kaugus mõjutab saadavat takistuse väärtust. Seega peaks vahemaa sisemise elektroodi ja nahaketta vahel olema konstantne ja minimaalne (1–2 mm).

23. Kui mõõdetud takistuse väärtus on üle 20 kΩ, võib see olla tingitud uuritava kemikaali jääkidest nahaketta marrasknaha pinnal. Võib proovida neid jääke veel kord eemaldada, näiteks sulgeda PTFE-toru kinnastatud pöidlaga ja loksutada seda umbes kümme sekundit; $MgSO_4$ lahus valatakse ära ja takistuse mõõtmist korratakse värske $MgSO_4$ lahusega.

24. Katseseadme omadused ja mõõtmed ning katse läbiviimise kord võivad mõjutada saadavaid TET väärtusi. Söövitavuse läviväärtus 5 kΩ on kehtestatud käesolevas katsemeetodis kirjeldatud konkreetse seadme ja mõõtmismeetodiga saadud andmete põhjal. Katsetingimuste muutmisel või teistsuguse seadme kasutamisel võivad lävi- ja kontrollväärtused olla teised. Seepärast on vaja selle meetodi ja takistuse läviväärtuste kaliibrimiseks teha mõõtmisi pädevusainetega, mis on valitud valideerimisuuringus kasutatud ainete hulgast (8, 9) või kemikaaliklassidest, mis on sarnased uuritavate ainete klassidega. Sobivate pädevusainete loetelu on esitatud tabelis 1.

▼M8

Värvaine sidumisel põhinevad meetodid

25. Teatavate mittesöövitavate ainetega kokkupuutumise tulemusena võib takistus muutuda läviväärtusest 5 kΩ väiksemaks, kuna sellised ained võimaldavad ioonidel läbi sarvkihi liikuda ja vähendavad seeläbi elektritakistust (9). Näiteks võivad pindaktiivsed neutraalsed orgaanilised ained ja kemikaalid (sealhulgas detergendid, emulgaatorid ja muud pindaktiivsed ained) eemaldada nahast lipiidid ning muuta kaitsekihi ioonidele paremini läbitavaks. Seepärast tuleks juhul, kui selliste kemikaalide puhul täheldatav TET väärtus on nahaketaste nähtavate kahjustuste puudumise korral umbes 5 kΩ või sellest väiksem, hinnata nii kontroll- kui ka katsekoe puhul värvaine imendumist, et teha kindlaks, kas saadud TET väärtus oli põhjustatud naha suurenenud läbilaskvusest või söövitusest (7, 9). Viimasel juhul tungib värvaine sulforodamiin B nahapinnale kantuna vigastatud sarvkihi kohalt kiiresti naha sisse ja põhjustab sarvkihialuste kudede värvumise. See konkreetne värvaine on püsiv paljude kemikaalide suhtes ning seda ei mõjuta allpool kirjeldatud ekstraheerimine.

Värvaine sulforodamiin B pealekandmine ja eemaldamine

26. Pärast TET määramist valatakse magneesiumsulfaat torust välja ja nahka uuritakse hoolikalt silmanähtavate kahjustuste suhtes. Kui silmanähtavaid suuri kahjustusi (nt perforatsiooni) ei esine, kantakse iga nahaketta marrasknaha pinnale kaheks tunniks 150 µl värvaine sulforodamiin B (happeline punane 52; CI number: 45100; CASi number: 3520-42-1) 10-protsendilist (massiühikutes mahuühiku kohta) lahust destilleeritud vees. Seejärel pestakse nahakettaid toatemperatuuril oleva või jahedama kraaniveega umbes kümme sekundit liigse/seondumata värvaine eemaldamiseks. Iga nahaketas eemaldatakse ettevaatlikult PTFE-torult ja asetatakse viaali (nt 20-milliliitrisesse klaasist stsintillatsiooniviaali), mis sisaldab deioniseeritud vett (8 ml). Viaale loksutatakse ettevaatlikult viis minutit, et eemaldada kogu seondumata värvaine. Loputamist korratakse ning seejäreleemaldatakse nahakettad ja pannakse viaalidesse, mis sisaldavad 5 ml 30-protsendilist (massiühikutes mahuühiku kohta) naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) lahust destilleeritud vees, ning kettaid inkubeeritakse temperatuuril 60 °C hommikuni.

27. Pärast inkubeerimist nahakettad eemaldatakse ja visatakse ära ning järelejäänud lahust tsentrifuugitakse kaheksa minutit temperatuuril 21 °C (suhtelise tsentrifugaaljõuga ~175 *g*). Seejärel lahjendatakse supernatandist võetud 1 ml suurust proovi mahuliselt viis korda (st 1 ml + 4 ml) 30-protsendilise (massiühikutes mahuühiku kohta) SDSi lahusega destilleeritud vees. Lahuse optilist tihedust mõõdetakse lainepikkusel 565 nm.

Värvaine sisalduse arvutamine

28. Värvaine sulforodamiin B sisaldus ketta kohta arvutatakse optilise tiheduse väärtuste alusel (9) (sulforodamiin B molaarne ekstinktsioonikoefitsient lainepikkusel 565 nm on 8,7 × $l0^4$ja molekulmass 580). Sobiva kaliibrimiskõvera abil määratakse värvainesisaldus iga nahaketta puhul ning seejärel arvutatakse paralleelproovide keskmine värvainesisaldus.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

29. Saadud TET keskväärtus on vastuvõetav, kui paralleelse positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud väärtused jäävad katset läbi viivas laboris käesoleva meetodi kasutamise puhul vastuvõetavasse väärtusevahemikku. Vastuvõetavad takistusevahemikud eespool kirjeldatud metoodika ja seadme puhul on esitatud järgmises tabelis.

▼**M8**

Kontroll	Aine	Takistusevahemik (kΩ)
Positiivne	10 M soolhape	0,5–1,0
Negatiivne	Destilleeritud vesi	10–25

30. Värvaine sidumist iseloomustavad keskväärtused on vastuvõetavad tingimusel, et paralleelsete kontrollidega saadud väärtused jäävad kõnealuse meetodi puhul vastuvõetavasse vahemikku. Kontrollainete jaoks soovitatavad vastuvõetavad värvainesisalduse vahemikud on eespool kirjeldatud metoodika ja seadme puhul järgmised.

Kontroll	Aine	Värvainesisalduse vahemik (µg ketta kohta)
Positiivne	10 M soolhape	40–100
Negatiivne	Destilleeritud vesi	15–35

Tulemuste tõlgendamine

31. TET läviväärtus, mis võimaldab eristada söövitavaid uuritavaid kemikaale mittesöövitavatest, määrati kindlaks katsemeetodi optimeerimise käigus, seda kontrolliti valideerimiseelses etapis ning selle sobivus leidis kinnitust ametlikus valideerimisuuringus.

32. Allpool on esitatud roti naha TET-l põhineva, nahasöövituse hindamist võimaldava katsemeetodi puhul kasutatav prognoosimudel (9, 19), mis on seotud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemiga.

Uuritav kemikaal loetakse nahka mitte söövitavaks, kui:

i) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskväärtus on suurem kui (>) 5 kΩ või

ii) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskväärtus on sama suur või väiksem kui (≤) 5 kΩ ning

— nahaketastel ei täheldata silmanähtavaid kahjustusi (nt perforatsiooni) ja

— nahaketaste keskmine värvainesisaldus on väiksem kui (<) paralleelse positiivse kontrollina kasutatud 10 M HCl-ga töödeldud nahaketaste keskmine värvainesisaldus (positiivset kontrolli iseloomustavad väärtused on esitatud punktis 30).

Uuritav kemikaal loetakse nahka söövitavaks, kui:

i) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskväärtus on sama suur või väiksem kui (≤) 5 kΩ ning nahakettad on silmanähtavalt kahjustatud (nt perforeeritud) või

ii) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskväärtus on sama suur või väiksem kui (≤) 5 kΩ ning

— nahaketastel ei täheldata silmanähtavaid kahjustusi (nt perforatsiooni), kuid

▼M8

— nahaketaste keskmine värvainesisaldus on sama suur või suurem kui (≥) paralleelse positiivse kontrollina kasutatud 10 M HCl-ga töödeldud nahaketaste keskmine värvainesisaldus (positiivset kontrolli iseloomustavad väärtused on esitatud punktis 30).

33. Ühese klassifitseerimistulemuse puhul peaks piisama ühest mõõtmistsüklist (katsest), mille käigus analüüsitakse uuritava kemikaali toimet paralleelselt vähemalt kolmele nahakettale. Ebaselgete tulemuste puhul – näiteks kui paralleelproovidega saadud mõõtmisandmed lahknevad ja/või TET keskväärtus on 5 ± 0,5 kΩ – tuleks kaaluda vajadust viia läbi veel üks sõltumatu mõõtmistsükkel (katse) ning esimeses kahes mõõtmistsüklis (katses) saadud tulemuste lahknevuse korral veel kolmaski mõõtmistsükkel (katse).

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

34. Uuritava kemikaali ning positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud takistuse väärtused (kΩ) ja vajaduse korral värvainesisalduse väärtused (µg ketta kohta) tuleks esitada tabelina, millesse kantakse igas mõõtmistsüklis (katses) iga üksiku paralleelproovina kasutatud kettaga saadud andmed ning samuti keskväärtused ± standardhälve. Esitatakse kõikide korduskatsete tulemused. Iga uuritava kemikaali puhul tuleks esitada teave nahaketastes täheldatud kahjustuste kohta.

Katseprotokoll

35. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollained:

— ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— allikas ja partii number, kui see on olemas;

— vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);

— uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;

— säilitustingimused.

Katseloomad:

— kasutatud liin ja sugu;

— loomade vanus doonorloomana kasutamise hetkel;

— päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;

— naha ettevalmistamise üksikasjad.

▼**M8**

Katsetingimused:

— katseseadme kaliibrimiskõverad;

— värvaine sidumise katset iseloomustavad kaliibrimiskõverad, optilise tiheduse mõõtmiseks kasutatud ribafiltri spektrivahemik ja vajaduse korral mõõteseadmega (nt spektrofotomeetriga) saavutatav optilise tiheduse väärtuste lineaarsusvahemik;

— TET mõõtmise meetodi üksikasjad;

— vajaduse korral üksikasjalik teave värvaine sidumise hindamiseks kasutatud meetodi kohta;

— katses kasutatud annused, kokkupuuteperioodi(de) kestus ja kokkupuutetemperatuur(id);

— kokkupuuteperioodi järgsete pesemistoimingute üksikasjad;

— iga uuritava kemikaali ja kontrollide (positiivse ja negatiivse kontrolli) puhul paralleelproovidena kasutatud nahaketaste arv;

— kõikide katsemeetodis tehtud muudatuste kirjeldus;

— viide varasematele andmetele mudeli kohta. See hõlmab vähemalt järgmisi aspekte:

  i) positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud, kilo-oomides väljendatud TET väärtuste vastuvõetavus lähtuvalt positiivset ja negatiivset kontrolli iseloomustavatest takistusevahemikest;

  ii) positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud, nahaketta kohta mikrogrammides väljendatud värvainesisalduse väärtuste vastuvõetavus lähtuvalt positiivset ja negatiivset kontrolli iseloomustavatest värvainesisalduse vahemikest;

  iii) katsetulemuste vastuvõetavus lähtuvalt paralleelproovidena kasutatud nahaketastega saadud varasemate tulemuste varieeruvusest;

— kasutatud otsustuskriteeriumide/prognoosimudeli kirjeldus.

Tulemused:

— TET mõõtmise katsetes ja vajaduse korral värvaine sidumise katsetes iga uuritava kemikaali ja kontrolliga saadud, tabelina esitatavad andmed iga mõõtmistsükli (katse) ja iga paralleelproovina kasutatud nahaketta (iga üksiku looma ja nahaproovi) kohta, samuti vastavad keskväärtused, standardhälbed ja variatsioonikordajad;

— mis tahes täheldatud toime kirjeldus;

— klassifitseerimistulemused lähtuvalt kasutatud prognoosimudelist/otsustuskriteeriumidest.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Viies, täiendatud väljaanne. ÜRO, New York ja Genf. Kättesaadav aadressil [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Käesoleva lisa peatükk B.4 „Äge nahaärritus/-söövitus“.

(3) Käesoleva lisa peatükk B.40b „*In vitro* nahasöövitus: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.

(4) Käesoleva lisa peatükk B.65 „*In vitro* membraanibarjääri katsemeetod nahasöövituse uurimiseks“.

(5) Käesoleva lisa peatükk B.46 „*In vitro* nahaärritus: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.

(6) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., ja Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23: 219–255.

(8) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem J. H., Gerner I., Walker A. P., ja Worth, A. P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12: 471–482.

(9) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H.-G., ja Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. In Vitro* 12: 483–524.

(10) Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., ja Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23: 129–147.

(11) Alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (ICCVAM) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity). Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC10), 3. aprill 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* 26: 275–280.

(14) ICCVAM (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion Testing as described in TG 430. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 218. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M8**

(16) Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A., ja Rhodes, C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test – Modifications and Validation. *Food Chem. Toxicol.* 24: 507–512.

(17) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J., ja Gardner, J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6: 191–194.

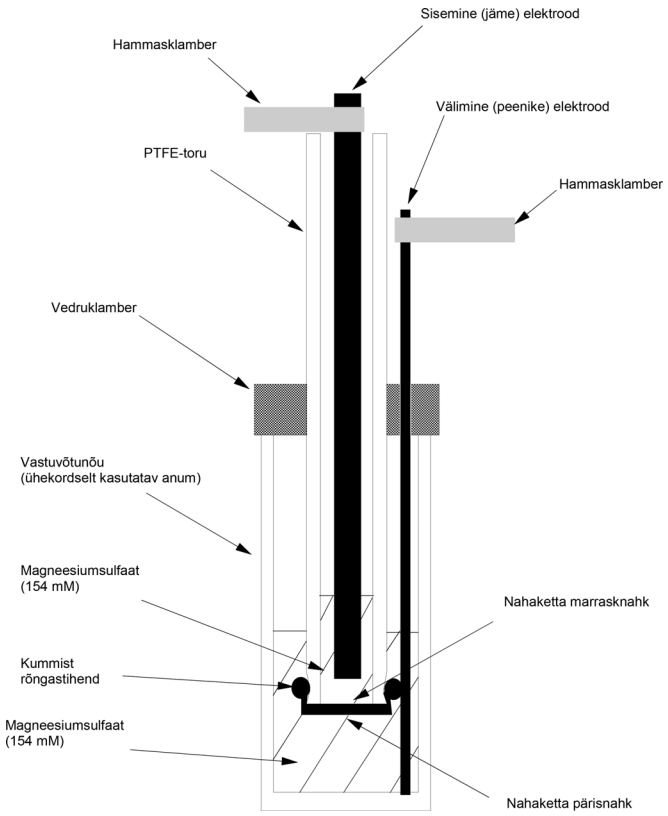
(18) Eskes, C., Detappe, V., Koëter, H., Kreysa, J., Liebsch, M., Zuang, V., Amcoff, P., Barroso, J., Cotovio, J., Guest, R., Hermann, M., Hoffmann, S., Masson, P., Alépée, N., Arce, L. A., Brüschweiler, B., Catone, T., Cihak, R., Clouzeau, J., D'Abrosca, F., Delveaux, C., Derouette, J. P., Engelking, O., Facchini, D., Fröhlicher, M., Hofmann, M., Hopf, N., Molinari, J., Oberli, A., Ott, M., Peter, R., Sá-Rocha, V. M., Schenk, D., Tomicic, C., Vanparys, P., Verdon, B., Wallenhorst, T., Winkler, G. C., ja Depallens, O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62: 393–403.

(19) TET mõõtmise standardne töökord (detsember 2008). Andmebaasi *INVITTOX* katse-eeskiri nr 115 „Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test".

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

Joonis 1

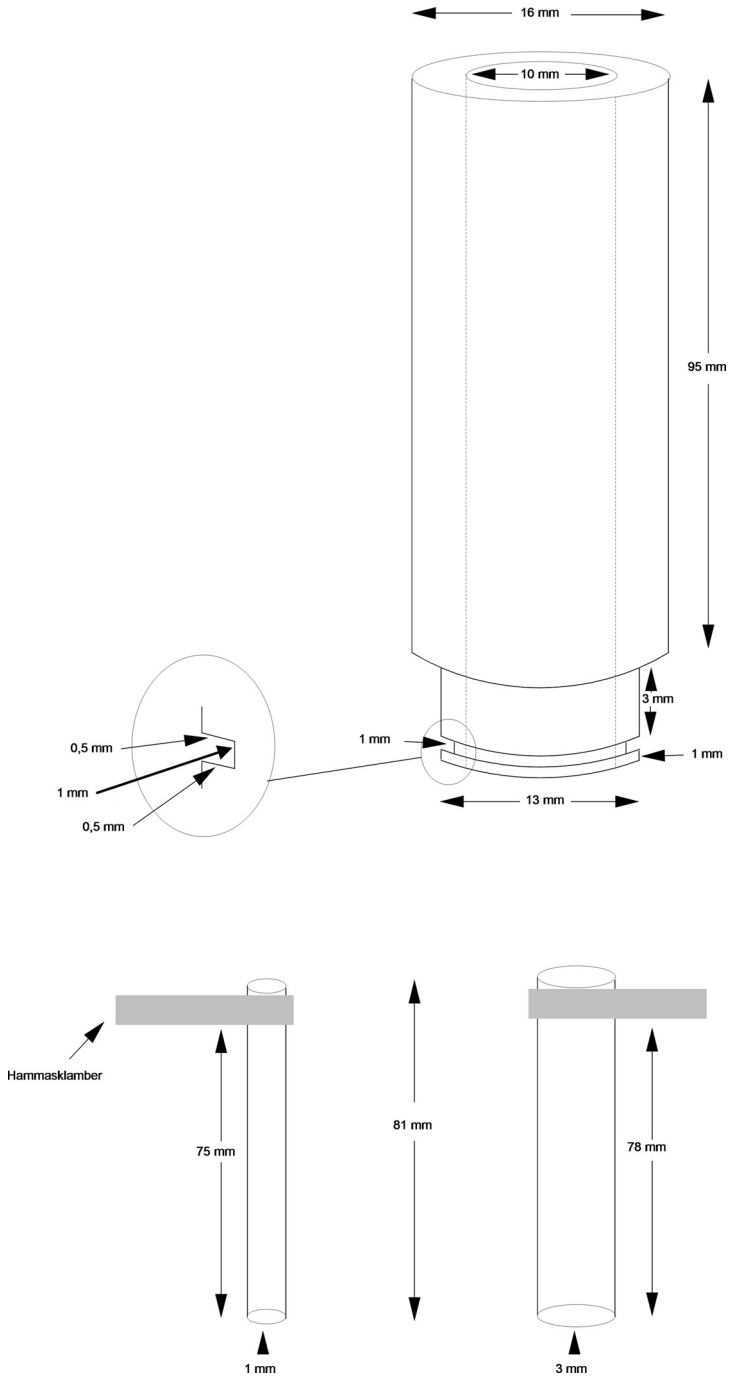
Roti Naha Tet Mõõtmiseks Kasutatav Seade



▼**M8**

Joonis 2

Polütetrafluoroetüleentoru (Ptfe-Toru) Ja Vastuvõtunõu Ning Kasutatavate Elektroodide Mõõtmed



Olulised tegurid eespool kujutatud seadme puhul:

— PTFE-toru siseläbimõõt;

— elektroodide pikkus peaks PTFE-toru ja vastuvõtunõuga võrreldes olema selline, et nahaketas ei puutuks vastu elektroode ja elektroodid oleks teatavas standardpikkuses $MgSO_4$ lahusega kokkupuutes;

▼**M8**

— $MgSO_4$ lahuse hulk vastuvõtunõus peaks olema selline, et vedeliku sügavus võrreldes PTFE-torus oleva vedeliku tasemega vastaks joonisel 1 näidatule;

— nahaketas peaks olema kinnitatud PTFE-toru külge piisavalt hästi, et elektritakistus iseloomustaks tõeselt naha omadusi.

▼**M8**

Liide

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (20).

GHS (ÜRO ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavituselemente nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (1).

In vivo *nahasöövitus* – pöördumatu nahakahjustuse tekkimine, st läbi marrasknaha pärisnahani ulatuva nähtava nekroosi tekkimine pärast uuritava kemikaali pealekandmist kuni neljaks tunniks. Tüüpilised söövitusnähud on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

Kemikaal – aine või segu.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokkusegamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MS – mittesöövitav.

(Mõõtmis)tsükkel – ühe uuritava kemikaali analüüsimine üheaegselt vähemalt kolmel paralleelproovina kasutataval nahakettal.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

S – söövitav.

Segu – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (20).

▼M8

Transkutaanne elektritakistus (TET) – naha elektrilise impedantsi näitaja, mida väljendatakse takistusena kilo-oomides. Lihtne ja töökindel meetod kaitsekihina toimimise hindamiseks Wheatstone'i sillana töötava seadme abil, millega registreeritakse nahka läbiv ioonivoog.

Tulemuslikkuse standardid – valideeritud katsemeetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse mehhanismilt ja tööpõhimõttelt sarnase kavandatud katsemeetodi võrreldavust. Need hõlmavad: i) katsemeetodi olulisi elemente, ii) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja iii) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel.

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (20).

Täpsus – katsemeetodiga saadud tulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (20).

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (20).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Vastavus – katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategoriseeritav tulemus; üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse mõnikord täpsuse tähenduses ja see on määratletud kui õigesti positiivseks või negatiivseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide uuritud kemikaalide seas. Vastavus sõltub väga suurel määral positiivsete tulemuste osakaalust uuritavale kemikaalile vastavat liiki kemikaalide hulgas (20).

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

▼**M8**

B.40b. *IN VITRO* NAHASÖÖVITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 431 (2016). Nahasöövituse all mõistetakse läbi marrasknaha pärisnahani ulatuva nähtava nekroosina avalduva pöördumatu nahakahjustuse tekkimist pärast uuritava kemikaaliga töötlemist, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1) ning Euroopa Liidu (EL) määruses nr 1272/2008, milles käsitletakse ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (edaspidi „CLP-määrus“) ([1]). Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi B.40b näol on tegemist *in vitro* meetodiga, mis võimaldab tuvastada mittesöövitavaid ja söövitavaid aineid ja segusid kooskõlas ÜRO GHSi ja CLP-määrusega. Meetodiga on osaliselt võimalik liigitada söövitavaid kemikaale alamkategooriatesse.

2. Kemikaalide võimaliku nahka söövitava toime hindamisel on tavapäraselt kasutatud laboriloomi (katsemeetod B.4, mis on samaväärne algselt 1981. aastal vastu võetud ning aastatel 1992, 2002 ja 2015 muudetud OECD katsejuhendiga nr 404) (2). Peale käesoleva katsemeetodi B.40b on valideeritud ja vastu võetud veel kaks *in vitro* katsemeetodit kemikaalide võimaliku nahka söövitava toime tuvastamiseks: katsemeetodid B.40 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 430) (3) ja B.65 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435) (4). Peale selle on vastu võetud *in vitro* katsemeetod B.46 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 439) (5) võimaliku nahka ärritava toime hindamiseks. OECD juhenddokumendis nahasöövituse ja -ärrituse puhul kasutatava katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (6).

3. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimtervisega seotud lõppnäitajana nahasöövitust. Selle meetodi puhul kasutatakse inimese rekonstrueeritud marrasknahka, mille saamiseks kasutatakse inimese marrasknaha transformeerumata keratinotsüüte ja mis on oma histoloogiliste, morfoloogiliste, biokeemiliste ja füsioloogiliste omaduste poolest väga sarnane inimese naha pealmiste kihtidega, st marrasknahaga. Vastavasisuline OECD katsejuhend võeti algselt vastu 2004. aastal ja seda ajakohastati 2013. aastal, et lisada täiendavad inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelitel põhinevad katsemeetodid ning võimalus kasutada neid meetodeid selleks, et toetada söövitavate kemikaalide liigitamist alamkategooriatesse, samuti 2015. aastal, et lisada viide juhenddokumendile katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta ning võimaldada ühe eluvõimelisuse mõõtmiseks sobiva alternatiivse meetodi kasutuselevõttu.

4. Käesolev katsemeetod hõlmab nelja turul kättesaadavat inimese rekonstrueeritud marrasknaha valideeritud katsemudelit. Neist kahe – standardmudeli (SM) EpiSkin™ ja meetodi EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) – puhul on läbi viidud nii valideerimiseelsed uuringud (7) kui ka ametlik valideerimisuuring nahasöövituse hindamiseks (8, 9, 10, 11, 12) (allpool on neile osutatud kui valideeritud standardmeetoditele (VSM)). Kõnealuste uuringute tulemusena esitati soovitus, mille kohaselt võib eespool nimetatud kahte VSMi regulatiivsel eesmärgil kasutada söövitavate (S) ainete eristamiseks mittesöövitavatest (MS) ning peale selle võib mudelit EpiSkin™ kasutada

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼**M8**

selleks, et toetada söövitavate ainete liigitamist alamkategooriatesse (13, 14, 15). Ülejäänud kahe turul kättesaadava inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva nahasöövituse *in vitro* katsemudeliga on tulemuslikkuse standarditest lähtuval valideerimisel saadud tulemused, mis on sarnased VSMiga EpiDerm™ saadud tulemustega (16, 17, 18). Need mudelid on SkinEthic™ RHE ([1]) ja epiCS® (varasema nimega EST-1000) ning neid võib samuti kasutada regulatiivsel eesmärgil, et eristada söövitavaid aineid mittesöövitavatest (19, 20). Valideerimisjärgsete uuringute kohaselt, mille viisid aastatel 2012–2014 läbi inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevate mudelite tootjad vastavalt täiustatud katse-eeskirjale, millega nähakse ette uuritavate kemikaalide põhjustatud mittespetsiifilisest MTT redutseerumisest tulenevad parandused, on kõnealuste meetodite tulemuslikkus nii söövitavate ja mittesöövitavate kemikaalide eristamisel kui ka söövitavate kemikaalide alamkategooriatesse liigitamise toetamisel varem eeldatust suurem (21, 22). Meetodite EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS® puhul saadud valideerimisjärgsete andmete täiendava statistilise analüüsi teel on tehtud kindlaks alternatiivsed prognoosimudelid, mis võimaldavad suurendada nende meetodite ennustusvõimet alamkategooriatesse liigitamisel (23).

5. Enne kui regulatiivsel eesmärgil nahasöövituse hindamiseks saab VSMide kõrval kasutada mõnda muud inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevat soovitud sarnast või muudetud *in vitro* katsemeetodit, tuleks teha kindlaks sellise meetodi usaldusväärsus, asjakohasus (täpsus) ja piirangud kavandatava kasutusotstarbe puhul, et tagada selle sarnasus VSMidega kooskõlas tulemuslikkuse standardites sätestatud nõuetega (24), mis on kehtestatud kooskõlas OECD juhenddokumendis nr 34 esitatud põhimõtetega (25). Andmete vastastikune tunnustamine on tagatud üksnes pärast seda, kui tulemuslikkuse standarditele vastav mis tahes välja pakutud uus või ajakohastatud katsemeetod on läbi vaadatud ja asjaomasesse katsejuhendisse lisatud. Kõnealusesse katsejuhendisse lisatud katsemudeleid võib kasutada *in vitro* nahasöövituse hindamise meetodiga saadavaid katsetulemusi käsitlevate siseriiklike nõuete järgimiseks ning seejuures saadakse kasu andmete vastastikusest tunnustamisest.

MÕISTED

6. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Käesolev katsemeetod võimaldab tuvastada mittesöövitavaid ja söövitavaid aineid ja segusid kooskõlas ÜRO GHSi ja CLP-määrusega. Ühtlasi võimaldab katsemeetod toetada söövitavate ainete ja segude vabatahtlikku liigitamist 1A alamkategooriasse kooskõlas ÜRO GHSiga (1), samuti 1B ja 1C alamkategooriate ühiskategooriasse (21, 22, 23). Käesoleva katsemeetodi piiranguna ei võimalda see teineteisest eristada nahka söövitavaid 1B ja 1C alamkategooria kemikaale kooskõlas ÜRO GHSi ja CLP-määrusega, kuna *in vivo* nahka söövitavaid 1C alamkategooriasse kuuluvaid tuntud kemikaale on vähe. Katsemudelid EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS® võimaldavad liigitamist alamkategooriatesse (st 1A alamkategooriasse, 1B ja 1C ühiskategooriasse ning mittesöövitavaks).

8. Valideerimisel, mille tulemusena toetatakse käesoleva katsemeetodiga hõlmatud katsemudelite kasutamist mittesöövitavate ja söövitavate kemikaalide tuvastamiseks, uuriti paljusid eri kemikaale, peamiselt eraldi aineid; valideerimisuuringu empiirilises andmebaasis on 60 kemikaali paljudest eri kemikaaliklassidest (8, 9, 10). Katsed meetodi tundlikkuse, spetsiifilisuse ja täpsuse ning tulemuste laborisisese reprodutseeritavuse tõendamiseks alamkategooriatesse

([1]) Mõiste „inimese rekonstrueeritud marrasknahk“ ingliskeelse vaste lühendit RhE (*Reconstructed human Epidermis*) kasutatakse kõikide inimese rekonstrueeritud marrasknaha tehnoloogial põhinevate mudelite puhul. Mudeli SkinEthic™ puhul kasutatava lühendi RHE tähendus on sama, ent kuna see on osa nimest, mille all kõnealust konkreetset katsemeetodit turustatakse, kirjutatakse see läbivalt suurtähtedega.

▼M8

liigitamisel viisid läbi katsemeetodi väljatöötajad ning saadud tulemused vaatas läbi OECD (21, 22, 23). Kokkuvõetuna nähtub olemasolevatest andmetest, et käesolev katsemeetod on kasutatav paljude eri kemikaaliklasside ja eri füüsikalises olekus ainete, sealhulgas vedelike, pooltahkete ja tahkete ainete ning vahade puhul. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Võimaluse korral tuleks tahked ained enne kasutamist peeneks pulbriks jahvatada; proovi muul viisil eeltöötlemine ei ole vajalik. Kui on võimalik tõendada, et käesolevas katsemeetodis kirjeldatud katsemudeleid ei saa teatud kindla kategooria uuritavate kemikaalide puhul kasutada, tuleks hoiduda nende kasutamisest sellise kategooria uuritavate kemikaalide puhul. Peale selle saab käesolevat katsemeetodit ainete kõrval eeldatavalt kasutada ka segude puhul. Ent kuna segud kuuluvad paljudesse eri kategooriatesse ja on eri koostisega ning nende kasutamise kohta katses on praegu piiratud hulgal teavet, tuleks juhul, kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria segude puhul kasutada (nt allikas 26 välja pakutud strateegia abil), hoiduda selle kasutamisest sellise kategooria segude puhul. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud. Gaase ja aerosoole ei ole valideerimisuuringutes veel hinnatud (8, 9, 10). Ehkki on võimalik, et neidki saab uurida inimese rekonstrueeritud marrasknaha kasutamisel põhineva tehnoloogia abil, ei võimalda praegune katsemeetod gaaside ega aerosoolide uurimist.

9. Uuritavad kemikaalid, mis neelavad valgust samas vahemikus kui MTT formasaan, ning vitaalvärvaine MTT otsest MTT formasaaniks redutseerumist põhjustada võivad uuritavad kemikaalid võivad segada kudede eluvõimelisuse mõõtmist ja tingida vajaduse kasutada tulemuste korrigeerimiseks kohandatud kontrolle. Sõltuvalt uuritava kemikaali põhjustatud kõrvalekallete laadist ja MTT formasaani mõõtmise meetodist võib olla vaja kasutada eri liiki kohandatud kontrolle (vt punktid 25–31).

10. Ehkki käesolev katsemeetod ei võimalda saada piisavat teavet nahaärrituse kohta, tuleks tähele panna, et tervisemõjuna hinnatavat *in vitro* nahaärritust käsitletakse konkreetselt katsemeetodis B.46, mis põhineb samal inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsesüsteemil, ehkki seal kasutatakse teistsugust katse-eeskirja (5). Ühekordse nahakaudse kokkupuute järel nahale avalduva lokaalse toime täielikku hindamist on kirjeldatud OECD juhenddokumendis katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (6). Nimetatud lähenemisviisiga nähakse ette, et enne elusloomadega katsete tegemise kaalumist viiakse läbi *in vitro* katsed, mille abil hinnatakse nahasöövitust (näiteks käesolevas katsemeetodis kirjeldatud viisil) ja nahaärritust. Inimese naha kasutamine toimub mõistagi kooskõlas asjaomases riigis kehtivate ja rahvusvaheliste eetiliste tõekspidamiste ja tingimustega.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Uuritav kemikaal kantakse paikselt kolmemõõtmelisele inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelile, mis koosneb inimese marrasknaha transformeerumata keratinotsüütidest, mida on kasvatatud nii, et need moodustavad inimese mitmekihilise tugevalt diferentseerunud marrasknaha mudeli. See koosneb korrastatud basaalkihist, ogakihist ja sõmerkihist ning mitmekihilisest sarvkihist, mis sisaldab rakkudevahelisi õhukesi lipiidikihte, kus on analoogselt *in vivo* koele esindatud peamiste lipiidiklasside lipiidid.

▼M8

12. Inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva katsemeetodi puhul lähtutakse eeldusest, et söövitavad kemikaalid suudavad difusiooni või erosiooni teel tungida läbi sarvkihi ja on sellest allpool paiknevate kihtide rakkudele tsütotoksilised. Rakkude eluvõimelisuse hindamiseks jälgitakse vitaalvärvaine MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülsinise tetrasooliumbromiid; CASi number: 298-93-1) ensümaatilist muundumist siniseks formasaansoolaks, mida mõõdetakse kvantitatiivselt pärast kudedest ekstraheerimist (27). Söövitavad kemikaalid tehakse kindlaks nende võime järgi vähendada rakkude eluvõimelisust nii palju, et see jääb allapoole kindlaksmääratud läviväärtust (vt punktid 35 ja 36). On tõendatud, et inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev nahasöövituse hindamiseks kasutatav katsemeetod võimaldab prognoosida katsemeetodi B.4 kohaselt mõõdetavat nahka söövitavat *in vivo* toimet küülikutel (2).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

13. Enne käesoleva katsemeetodi kohasest neljast inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevast valideeritud katsemudelist ükskõik millise regulaarset kasutamist tuleks labori tehnilise pädevuse tõendamiseks õigesti liigitada kaksteist tabelis 1 loetletud pädevusainet. Kui asjaomast meetodit kasutatakse täpsemaks liigitamiseks, tuleks tõendada ka õigesti alamkategooriatesse liigitamise võimekust. Kui mõni loetletud ainetest ei ole kättesaadav või kui see on põhjendatav, võib kasutada mõnda muud ainet, mille kohta on olemas piisavad *in vivo* ja *in vitro* võrdlusandmed (nt võrdluskemikaalide loetelust (24) valitud ainet), ent üksnes juhul, kui kohaldatakse samu valikukriteeriume, nagu on kirjeldatud tabelis 1.

Tabel 1

Pädevusainete loetelu ([1])

Aine	CASi nr	Kemikaaliklass ([2])	ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane *in vivo* tulemustel põhinev kategooria ([3])	VSMga saadud *in vitro* tulemustel põhinev kategooria ([4])	MTT redutseerija ([5])	Füüsikaline olek
In vivo söövitavad 1A alamkategooria kemikaalid						
Bromoäädikhape	79-08-3	Orgaaniline hape	1A	(3) 1A	—	T
Boortrifluoriiddihüdraat	13319-75-0	Anorgaaniline hape	1A	(3) 1A	—	V
Fenool	108-95-2	Fenool	1A	(3) 1A	—	T
Dikloroatsetüülkloriid	79-36-7	Elektrofiil	1A	(3) 1A	—	V
In vivo söövitavad 1B ja 1C alamkategooriate ühiskategooria kemikaalid						
Glüoksüülhappe monohüdraat	563-96-2	Orgaaniline hape	1B/1C	(3) 1B/1C	—	T
Piimhape	598-82-3	Orgaaniline hape	1B/1C	(3) 1B/1C	—	V
Etanoolamiin	141-43-5	Orgaaniline alus	1B	(3) 1B/1C	J	Viskoosne

▼**M8**

Aine	CASi nr	Kemikaaliklass ([2])	ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane *in vivo* tulemustel põhinev kategooria ([3])	VSMga saadud *in vitro* tulemustel põhinev kategooria ([4])	MTT redutseerija ([5])	Füüsikaline olek
In vivo söövitavad 1A alamkategooria kemikaalid						
Soolhape (14,4 %)	7647-01-0	Anorgaaniline hape	1B/1C	(3) 1B/1C	—	V
In vivo mittesöövitavad kemikaalid						
Fenetüülbromiid	103-63-9	Elektrofiil	MS	(3) MS	J	V
4-amino-1,2,4-triasool	584-13-4	Orgaaniline alus	MS	(3) MS	—	T
4-(metüültio)bensaldehüüd	3446-89-7	Elektrofiil	MS	(3) MS	J	V
Lauriinhape	143-07-7	Orgaaniline hape	MS	(3) MS	—	T

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber; J – jah; MS – mittesöövitav; T – tahkis; V – vedelik; VSM – valideeritud standardmeetod.

([1]) Need pädevusained, mis on järjestatud esmalt nii, et söövitavad ained on esitatud enne mittesöövitavaid aineid, ning seejärel söövitavuse alamkategooria ja edasi kemikaaliklassi järgi, on valitud ainete hulgast, mida kasutati Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Euroopa Keskuse (ECVAM) uuringutes mudelite EpiSkin™ ja EpiDerm™ valideerimiseks (8, 9, 10) ning valideerimisjärgsetes uuringutes vastavalt andmetele, mille on esitanud mudelite EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ ja epiCS® väljatöötajad (23). Kui ei ole teisiti märgitud, uuriti kõnealuseid aineid sellise puhtusastme juures, nagu need kaubanduslikust allikast osteti (8, 10). Ainete valimisel lähtuti võimalikult suurel määral sellest, et: i) need oleksid VSMide abil mõõdetava või ennustatava eri söövitavusega (nt mittesöövitavad, nõrgalt söövitavad ja tugevalt söövitavad ained), ii) need esindaksid valideerimisuuringutes kasutatud kemikaaliklasse, iii) ainetel oleks täpselt määratletud keemiline struktuur, iv) VSMi abil nendega saadud tulemused oleksid reprodutseeritavad, v) need võimaldaksid saada standardse *in vivo* katsemeetodiga selgepiirilisi tulemusi, vi) need oleksid turul kättesaadavad ning vii) nende kõrvaldamise kulud ei oleks liiga suured.

([2]) Kemikaaliklass, mille on kindlaks määranud Barratt *et al.* (8).

([3]) ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastele 1A, 1B ja 1C alamkategooriatele vastavad ÜRO I, II ja III pakendirühm.

([4]) Tabelis esitatud prognoos, mis põhineb *in vitro* tulemustel, on saadud katsemudelite EpiSkin™ ja EpiDerm™ (VSMid) kasutamisel valideerimisjärgsetes katsetes, mille viisid läbi kõnealuste meetodite väljatöötajad.

([5]) Nahasöövituse hindamiseks tehtud ECVAMi valideerimisuuringutes saadud eluvõimelisuse näitajaid ei ole korrigeeritud MTT otsese redutseerimise suhtes (valideerimisuuringutes ei kasutatud surmatud rakkudega kontrolle). Ent nende tabelis esitatud andmete puhul, mis on saadud katsemeetodite väljatöötajate tehtud valideerimisjärgsetest katsetest, on kasutatud kohandatud kontrolle (23).

14. Pädevuse tõendamise osana soovitatakse kasutajal pärast kudede saabumist kontrollida nende toimivust kaitsekihina vastavalt inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva asjaomase mudeli tootja kirjeldusele. See on eriti oluline pärast kudede pikaajalist transporti või tarnet pika vahemaa taha. Pärast katsemeetodi edukat kasutuselevõttu ja selle kasutamise pädevuse tõendamist ei ole selline tavapärane kontrollimine enam vajalik. Meetodi regulaarse kasutamise korral soovitatakse siiski jätkata kaitsekihina toimivuse hindamist korrapäraste ajavahemike järel.

KATSE KÄIK

15. Allpool on esitatud üldine kirjeldus käesoleva katsemeetodi kohaste nahasöövituse hindamiseks kasutatavate inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsemudelite elementide ja asjaomase katsemenetluse kohta. Käesoleva katsemeetodi raames kasutamiseks heaks kiidetud teaduslikult usaldusväärsed inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelid EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE ja epiCS® (16, 17, 19, 28, 29, 30, 31, 32, 33) on turul kättesaadavad. Standardne töökord kõnealusest neljast iga mudeli kasutamiseks on samuti kättesaadav (34, 35, 36, 37) ning meetodite põhielemendid on kokkuvõtlikult esitatud 2. liites. Ükskõik millise kõnealuse

▼M8

mudeli kasutuselevõtmisel ja rakendamisel laboris soovitatakse järgida asjaomast standardset töökorda. Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud, inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva kõnealuse nelja mudeli kasutamisel peaksid olema täidetud järgmised tingimused.

INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEVA KATSEMEETODI ELEMENDID

Üldtingimused

16. Epiteelkoe rekonstrueerimiseks tuleks kasutada inimese transformeerumata keratinotsüüte. Talitlusvõimelise sarvkihi all peaks olema mitu kihti eluvõimelisi epiteelirakke (basaalkiht, ogakiht ja sõmerkiht). Sarvkiht peaks olema mitmekihiline ja sisaldama selliseid vajalikke lipiide, et moodustuks funktsionaalne kaitsekiht, mis suudab takistada tsütotoksiliste võrdluskemikaalide, näiteks naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) või Triton X-100 kiiret läbitungimist. Nimetatud kaitsekihina toimimist tuleks tõendada; selle hindamiseks võib teha kindlaks kontsentratsiooni, mille juures võrdluskemikaal vähendab kindlaksmääratud kokkupuuteaja vältel kudede eluvõimelisust 50 % võrra (IC_{50}), või määrata kokkupuuteaja, mille vältel võrdluskemikaal vähendab teatud kindla kontsentratsiooni juures kudede eluvõimelisust 50 % võrra (ET_{50}) (vt punkt 18). Kasutatav inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel peaks olema selline, et aine ei saaks jõuda eluskoeni sarvkihti läbimata, kuna vastasel korral ei ole nahakaudse kokkupuute mudeliga saadud tulemused usaldusväärsed. Kasutatav mudel ei tohiks olla saastunud bakterite, viiruste, mükoplasma ega seentega.

Funktsionaaltingimused

Eluvõimelisus

17. Kudede eluvõimelisuse kvantifitseerimiseks kasutatakse MTT-põhist meetodit (27). Vitaalvärvaine MTT redutseeritakse inimese rekonstrueeritud marrasknaha eluvõimelistes rakkudes siniseks sadestuvaks MTT formasaaniks, mis ekstraheeritakse seejärel koest isopropanooli (või muu sarnase lahusti) abil. Ekstraheerimiseks kasutatava lahusti enda optiline tihedus peaks olema piisavalt väike, st < 0,1. Ekstraheeritud MTT formasaani kvantifitseerimiseks võib kasutada kas tavapärast neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist või HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (38). Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli kasutajad peaksid tagama, et mudeli iga kasutatav partii vastab negatiivse kontrolli kindlaksmääratud kriteeriumidele. Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/tarnija peaks kindlaks määrama negatiivse kontrolli optilise tiheduse väärtuste lubatud vahemiku (ülem- ja alampiiri). Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud, inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva nelja valideeritud katsemudeli puhul lubatud väärtusevahemikud negatiivse kontrolli optilise tiheduse jaoks on esitatud tabelis 2. HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutaja peaks negatiivse kontrolli vastuvõetavuse kriteeriumina kasutama tabelis 2 negatiivse kontrolli kohta esitatud optilise tiheduse väärtusevahemikku. Tuleks dokumentaalselt tõendada, et negatiivse kontrolliga töödeldud koed on kokkupuuteperioodi kestel kultuuris stabiilsed (võimaldavad saada sarnaseid optilise tiheduse väärtusi).

Tabel 2

Partii kvaliteedi kontrollimiseks kasutatav negatiivse kontrolli optilise tiheduse lubatud väärtusevahemik

	Vastuvõetavate väärtuste alampiir	Vastuvõetavate väärtuste ülempiir
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Toimimine kaitsekihina

18. Sarvkiht ja selle lipiidne koostis peavad olema sellised, et takistada teatud kindlate tsütotoksiliste võrdluskemikaalide (nt SDSi või Triton X-100) kiiret läbitungimist; seda hinnatakse IC_{50} või ET_{50} alusel (tabel 3). Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/müüja peaks lõppkasutajale kudede tarnimisel tõendama mudeli iga kasutatava partii puhul toimivust kaitsekihina (vt punkt 21).

Morfoloogia

19. Tuleks läbi viia inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli histoloogiline analüüs, et tõendada inimese marrasknahaga sarnaneva, basaal-, oga-, sõmer- ja sarvkihti sisaldava mitmekihilise struktuuri olemasolu ning inimese marrasknaha lipiidsele koostisele lähedase lipiidse koostise esinemist. Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/müüja peaks lõppkasutajale kudede tarnimisel esitama mudeli iga kasutatava partii histoloogilise analüüsi tulemused, millest nähtub kudede morfoloogia nõuetekohasus (vt punkt 21).

Reprodutseeritavus

20. Katsemeetodi kasutajad peaksid tõendama meetodiga saadavate positiivseid ja negatiivseid kontrolle iseloomustavate tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul. Peale selle tuleks käesolevat katsemeetodit kasutada üksnes juhul, kui inimese rekonstrueeritud marrasknaha asjaomase mudeli väljatöötaja/tarnija on esitanud andmed, millest nähtub söövitavate ja mittesöövitavate kemikaalidega, näiteks pädevusainete loetelust (tabel 1) valitud kemikaalidega saadavate tulemuste reprodutseeritavus pikema aja jooksul. Kui asjaomast meetodit kasutatakse täpsemaks liigitamiseks, tuleks tõendada tulemuste reprodutseeritavust ka alamkategooriatesse liigitamisel.

Kvaliteedikontroll

21. Asjaomast inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelit tuleks kasutada üksnes juhul, kui selle väljatöötaja/tarnija on tõendanud, et kasutatava mudeli iga partii vastab tootele kehtestatud kvaliteedikriteeriumidele, mille hulgas kõige olulisemad on eluvõimelisuse (punkt 17), kaitsekihina toimivuse (punkt 18) ja morfoloogiaga (punkt 19) seotud kriteeriumid. Sellised andmed esitatakse meetodi kasutajatele, et nad saaksid lisada selle teabe katseprotokolli. Söövitavate kemikaalide liigituse usaldusväärse prognoosimise eesmärgil on vastuvõetavad üksnes sellised tulemused, mis on saadud kvaliteedikontrolli edukalt läbinud koepartiidega. IC_{50} või ET_{50} väärtuste lubatud vahemiku (ülem- ja alampiiri) määrab kindlaks inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/tarnija. Kõnealuse nelja valideeritud katsemudeli puhul lubatud väärtusevahemikud on esitatud tabelis 3.

Tabel 3

Partii kvaliteedikontrolli kriteeriumid

	Vastuvõetavate väärtuste alampiir	Vastuvõetavate väärtuste ülempiir
EpiSkin™ (SM) (18-tunnine töötlus SDSiga) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 tundi	ET_{50} = 8,7 tundi
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET_{50} = 4,0 tundi	ET_{50} = 10,0 tundi
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET_{50} = 2,0 tundi	ET_{50} = 7,0 tundi

▼M8

Uuritava kemikaali ja kontrollkemikaalidega töötlemine

22. Iga uuritava kemikaali ja kontrolli puhul tuleks igal kokkupuuteperioodil kasutada vähemalt kahte paralleelset koeproovi. Nii vedelate kui ka tahkete kemikaalide puhul tuleks töötlemiseks kasutada piisavat kogust uuritavat kemikaali, et marrasknaha pind saaks ühtlaselt kaetud, ent seejuures tuleks hoiduda lõpmata suure annuse kasutamisest; see tähendab, et kemikaali tuleks peale kanda koguses vähemalt 70 µl/cm^2 või 30 mg/cm^2. Sõltuvalt mudelist tuleks marrasknaha pinda enne tahke kemikaali pealekandmist niisutada deioniseeritud või destilleeritud veega, et parandada uuritava kemikaali kontakti marrasknaha pinnaga (34, 35, 36, 37). Võimaluse korral tuleks tahket kemikaali kasutada peene pulbri kujul. Töötlemismeetod peaks olema uuritava kemikaali jaoks sobiv (vt nt allikad 34–37). Kokkupuuteperioodi lõppedes tuleks uuritav kemikaal veepõhisepuhverlahuse või 0,9 % NaCl lahusega marrasknaha pinnalt hoolikalt maha pesta. Sõltuvalt sellest, millist kõnealusest neljast inimese rekonstrueeritud marrasknaha valideeritud katsemudelist kasutatakse, tuleb iga uuritava kemikaali puhul kasutada kahte või kolme kokkupuuteperioodi (kõigi nelja mudeli puhul kokkupuuteperioode kestusega 3 minutit ja 1 tund ning mudeli EpiSkin™ puhul täiendavat kokkupuuteperioodi kestusega 4 tundi). Kasutatavast inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsemudelist ja konkreetsest kokkupuuteperioodist sõltuvalt võib kokkupuuteaegne inkubeerimistemperatuur varieeruda toatemperatuurist kuni 37 °C-ni.

23. Igas mõõtmistsüklis tuleks kasutada paralleelset negatiivset ja positiivset kontrolli selle tõendamiseks, et kudede eluvõimelisus (negatiivse kontrolli puhul), toimivus kaitsekihina ja sellest sõltuv kudede tundlikkus (positiivse kontrolli puhul) jääb varasemate andmete alusel kindlaks määratud lubatud piiridesse. Soovitatav positiivseks kontrolliks sobiv kemikaal on kasutatavast inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelist sõltuvalt jää-äädikhape või 8 N KOH. Tuleks silmas pidada, et 8 N KOH on MTT otsene redutseerija ja selle kemikaali puhul võib olla vaja kasutada kohandatud kontrolle, nagu on kirjeldatud punktides 25 ja 26. Soovitatav negatiivne kontroll on 0,9 % (massiühikutes mahuühiku kohta) NaCl või vesi.

Rakkude eluvõimelisuse mõõtmine

24. Käesoleva katsemeetodi raames tuleks rakkude eluvõimelisuse mõõtmiseks kasutada kvantitatiivset MTT-põhist meetodit (27). Koeproov asetatakse kolmeks tunniks sobiva kontsentratsiooniga (0,3 või 1 mg/ml) MTT lahusesse. Sadestunud sinine formasaan ekstraheeritakse seejärel lahusti (näiteks isopropanooli või hapestatud isopropanooli) abil ning formasaani kontsentratsiooni määramiseks mõõdetakse lahuse optiline tihedus lainepikkusel 570 nm – seejuures kasutatakse filtrit ribalaiusega kuni ± 30 nm – või rakendatakse HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (vt punktid 30 ja 31) (38).

25. Uuritav kemikaal võib MTT-põhise katse tulemusi moonutada tulenevalt MTT otsesest redutseerimisest siniseks formasaaniks ja/või värvuse muutmise kaudu, kui asjaomane uuritav kemikaal neelab looduslikult või töötlemisprotsessi tulemusena valgust samas vahemikus, mida kasutatakse formasaanilahuse optilise tiheduse mõõtmiseks (570 ± 30 nm; seda täheldatakse peamiselt siniste ja lillade kemikaalide puhul). Selliste uuritavate kemikaalide võimaliku segava mõju tuvastamiseks ja tulemuste korrigeerimiseks tuleks kasutada täiendavaid kontrolle, näiteks MTT mittespetsiifilist redutseerimist (NSMTT) kajastavat kontrolli ja mittespetsiifilist värvumist (NSC) kajastavat kontrolli (vt punktid 26–30). See on eriti oluline juhul, kui konkreetset uuritavat kemikaali ei saa loputamise teel koepinnalt täielikult eemaldada või kui see tungib marrasknahka ja jääb seega eluvõimelisuse MTT-põhise määramise ajaks kudedesse. Üksikasjalik kirjeldus selle kohta, kuidas korrigeerida tulemusi MTT otsese redutseerimise ja värvust muutvate ainete mõju suhtes, on esitatud asjaomast katsemudelit käsitlevas standardses töökorras (34, 35, 36, 37).

▼**M8**

26. MTT otseste redutseerijate tuvastamiseks tuleks lisada iga uuritavat kemikaali värskelt valmistatud MTT lahusesse (34, 35, 36, 37). Kui MTT lahus värvub uuritava kemikaali toimel siniseks/lillaks, siis käsitatakse asjaomast uuritavat kemikaali MTT otsese redutseerijana ning sel juhul tuleks tavapärasest neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisest või HPLC/UPLC-spektrofotomeetrial põhinevast määramisest sõltumatult kasutada täiendavat funktsionaalset kontrolli eluvõimetu marrasknahaga. Sellise täiendava funktsionaalse kontrolli puhul kasutatakse surmatud kudesid, mille metaboolne aktiivsus on peaaegu kadunud, kuid mis absorbeerivad uuritavat kemikaali eluvõimeliste kudedega sarnasel määral. Iga MTT-d redutseeriva kemikaaliga töödeldakse vähemalt kahte surmatud kudede paralleelproovi kokkupuuteperioodi kohta ning nende proovidega viiakse läbi täismahus nahasöövituskatse. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase MTT redutseerijaga kokkupuutes olnud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse sama MTT redutseerijaga kokkupuutes olnud surmatud kudedega saadud, MTT mittespetsiifilist redutseerimist kajastav protsentuaalse osakaaluna väljendatud väärtus (NSMTT(%)); nimetatud väärtused arvutatakse korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt analüüsitud negatiivset kontrolli iseloomustava väärtuse suhtes.

27. Värviliste uuritavate kemikaalide või vee või isopropanooliga kokku puutumisel värviliseks muutuvate kemikaalide võimaliku segava mõju tuvastamiseks ja täiendavate kontrollide kasutamise vajaduse üle otsustamiseks tuleks teha uuritava kemikaali spektraalanalüüs vees (kokkupuutekeskkond) ja/või isopropanoolis (ekstraheerimislahus). Kui uuritav kemikaal neelab vees ja/või isopropanoolis valgust vahemikus 570 ± 30 nm, tuleks kasutada täiendavaid värvumiskontrolle või teise võimalusena HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat; viimasel juhul ei ole kõnealused kontrollid vajalikud (vt punktid 30 ja 31). Tavapärasel neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisel töödeldakseiga segavat mõju avaldava värvilise uuritava kemikaaliga vähemalt kahte paralleelset eluskoe proovi kokkupuuteperioodi kohta ning nende proovidega viiakse läbi täismahus nahasöövituskatse, ent MTTga inkubeerimise etapis kasutatakse MTT lahuse asemel söödet, et saada mittespetsiifilist värvumist (NSC_{elus}) kajastavad kontrollproovid. Eluskudedele iseloomulikust bioloogilisest varieeruvusest tulenevalt tuleb NSC_{elus}-kontrolli kasutada igas mõõtmistsüklis iga kokkupuuteperioodi puhul samaaegselt uuritava värvilise kemikaaliga. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja MTT lahuses inkubeeritud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse kõnealuse segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja ilma MTT-ta söötmes inkubeeritud eluskudedega saadud, mittespetsiifilist värvumist kajastav protsentuaalse osakaaluna väljendatud väärtus (NSC_{elus} (%)), mille leidmiseks kasutatud kontrollproove on käideldud korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt.

28. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millega saadud tulemustest nähtub nii MTT otsese redutseerimise võime (vt punkt 26) kui ka värvusest tulenev segav mõju (vt punkt 27), on tavapärasel neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisel vaja kasutada eelmistes punktides kirjeldatud NSMTT-kontrolli ja NSC_{elus}-kontrolli kõrval veel kolmandat liiki kontrolli. See on tavaliselt vajalik tumedavärviliste (nt siniste, lillade ja mustade) uuritavate kemikaalide puhul, mis avaldavad MTT-põhises katses segavat mõju, kuna takistavad neile omase värvuse tõttu MTT otsese redutseerimise võime hindamist vastavalt punktis 26 kirjeldatule. Sellised uuritavad kemikaalid võivad seonduda nii eluskudede kui ka surmatud kudedega ja seepärast võib juhtuda, et NSMTT-kontrolli abil korrigeeritakse tulemusi mitte üksnes uuritava kemikaali põhjustatud MTT võimaliku otsese redutseerimise suhtes, vaid ka värvusest tuleneva segava mõju suhtes, mis ilmneb uuritava kemikaali seondumisel surmatud kudedega. See võib kaasa tuua kahekordse korrigeerimise, kuna NSC_{elus}-kontrolli abil juba korrigeeritakse tulemusi värvusest tuleneva segava mõju suhtes, mis ilmneb uuritava kemikaali seondumisel eluskudedega. Et hoida ära võimalikku kahekordset korrigeerimist värvusest tuleneva segava mõju suhtes, tuleb kasutada kolmandat kontrolli, mis võimaldab hinnata surmatud kudede mittespetsiifilist värvumist ($NSC_{surmatud}$). Selle täiendava kontrolli puhul töödeldakse uuritava kemikaaliga vähemalt kahte

▼M8

paralleelset surmatud kudede proovi kokkupuuteperioodi kohta ning nende proovidega viiakse läbi täismahus katse, ent MTTga inkubeerimise etapis kasutatakse MTT lahuse asemel söödet. Olenemata sellest, kui suur on sõltumatult läbi viidavate katsete/mõõtmistsüklite arv, piisab iga uuritava kemikaali puhul ühest $NSC_{surmatud}$-kontrollist, ent seda tuleks käidelda samaaegselt NSMTT-kontrolliga ja võimaluse korral tuleks kasutada sama partii kudesid. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse NSMTT(%) ja NSC_{elus} (%) ning liidetakse kõnealuse segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja ilma MTT-ta söötmes inkubeeritud surmatud kudedega saadud, mittespetsiifilist värvumist kajastav protsentuaalse osakaaluna väljendatud väärtus ($NSC_{surmatud}$ (%)); nimetatud väärtused arvutatakse korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt analüüsitud negatiivset kontrolli iseloomustava väärtuse suhtes.

29. On oluline silmas pidada, et MTT mittespetsiifilise redutseerimise ja värvusest tuleneva mittespetsiifilise segava mõju tulemusena võivad koeekstraktiga saadud näidud olla suuremad kui spektrofotomeetri lineaarsusvahemikule vastavad väärtused. Sellest lähtuvalt tuleks igas laboris enne regulatiivsel eesmärgil uuritavate kemikaalidega katsete alustamist teha kaubanduslikust allikast pärit MTT formasaani (CASi nr: 57360-69-7) abil kindlaks kasutatava spektrofotomeetri lineaarsusvahemik. Eelkõige on tavapärane neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmine spektrofotomeetriga MTT otseste redutseerijate ja värvusest tuleneva segava mõjuga uuritavate kemikaalide puhul asjakohane juhul, kui asjaomase uuritava kemikaaliga töödeldud kudede ekstraktide optiline tihedus jääb enne MTT otsese redutseerimise ja/või värvusest tuleneva segava mõju suhtes korrigeerimist spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku või kui uuritav kemikaal on eluvõimeliste kudede korrigeerimata protsentuaalse osakaalu alusel juba liigitatav söövitavaks (vt punktid 35 ja 36). Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millega saadud NSMTT(%) ja/või NSC_{elus} (%) on negatiivse kontrolliga võrreldуna > 50 %, tuleks siiski suhtuda tulemustesse ettevaatusega.

30. Tavapäraseks neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmiseks sobimatute värviliste uuritavate kemikaalide puhul, mis avaldavad MTT-põhises katses liiga tugevat segavat mõju, võib MTT formasaani määramiseks kasutada alternatiivina HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (vt punkt 31) (37). HPLC/UPLC-spektrofotomeetria võimaldab MTT formasaani enne selle kvantifitseerimist uuritavast kemikaalist eraldada (38). Sel põhjusel ei ole NSC_{elus}-kontroll ega $NSC_{surmatud}$-kontroll HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamisel uuritava kemikaali omadustest sõltumata kunagi vajalikud. NSMTT-kontrolli aga tuleks siiski kasutada, kui on põhjust eeldada, et uuritav kemikaal on MTT otsene redutseerija või selle värvus takistab MTT otsese redutseerimise võime hindamist (vastavalt punktis 26 kirjeldatule). Kui MTT formasaani määramiseks kasutatakse HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat, arvutatakse eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul saadud MTT formasaani piigi pindala protsentuaalse osakaaluna paralleelse negatiivse kontrolliga saadud MTT formasaani piigi pindalast. Kemikaalide puhul, mis on võimelised MTT-d otse redutseerima, arvutatakse kudedetegelik eluvõimelisus uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalse osakaaluna, millest on lahutatud NSMTT(%). Lõpuks tuleks märkida, et selliseid MTT otseseid redutseerijaid, mis võivad avaldada ka värvusest tulenevat segavat mõju ning mis jäävad pärast töötlemist kudedesse ja redutseerivad MTT-d nii tugevalt, et analüüsitavate koeekstraktide puhul täheldatud optiline tihedus (tavapärasel optilise tiheduse mõõtmisel) või piigi pindala (HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamisel) jääb väljapoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku, ei ole võimalik hinnata; seda juhtub eeldatavalt siiski väga harva.

▼M8

31. HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat võib MTT formasaani määramiseks kasutada iga liiki (värviliste, värvitute, MTT-d redutseerivate ja MTT-d mitteredutseerivate) uuritavate kemikaalide puhul (38). Kuna on olemas eri HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteeme, tuleks enne sellise süsteemi kasutamist koeekstraktides sisalduva MTT formasaani määramiseks tõendada asjaomase HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteemi nõuetekohasust; selleks tõendatakse vastavust teatud standardnäitajatega seotud vastuvõetavuskriteeriumidele, mille puhul on lähtutud bioanalüüsimeetodite valideerimist käsitlevates ettevõtjatele ette nähtud USA Toidu- ja Ravimiameti suunistes kirjeldatud kriteeriumidest (38, 39). Kõnealused põhinäitajad ja neile vastavad vastuvõetavuskriteeriumid on esitatud 4. liites. Kui 4. liites määratletud vastuvõetavuskriteeriumid on täidetud, loetakse asjaomane HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteem nõuetekohaseks ja seda võib hakata kasutama MTT formasaani määramiseks käesolevas katsemeetodis kirjeldatud katsetingimustes.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

32. Iga katsemeetodi puhul, kus kasutatakse inimese rekonstrueeritud marrasknaha nõuetekohast mudelit, peaks negatiivse kontrolliga töödeldud kudesid iseloomustav optiline tihedus kajastama kudede kvaliteeti vastavalt tabelis 2 kirjeldatule ega tohiks olla väiksem kui varasemate andmete põhjal kindlaks määratud alampiir. Positiivse kontrolliga, st jää-äädikhappe või 8 N KOH-ga töödeldud kudedega saadud tulemused peaksid kajastama kudede võimet reageerida söövitavale kemikaalile asjaomase katsemudeli puhul kasutatavates tingimustes (vt 2. liide). Paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste vaheline varieeruvus peaks inimese rekonstrueeritud marrasknaha iga valideeritud mudeli puhul jääma uuritava kemikaaliga ja/või kontrollkemikaaliga töötlemisel kõikide nõuete puhul vastuvõetavasse vahemikku (vt 2. liide) (näiteks ei tohiks kahe paralleelse koeprooviga saadud eluvõimelisuse näitajate vaheline erinevus olla suurem kui 30 %). Kui mõõtmistsüklis kasutatud negatiivse kontrolli või positiivse kontrolliga saadud väärtus jääb väljapoole lubatud vahemikku, loetakse asjaomases mõõtmistsüklis saadud tulemused kehtetuks ning mõõtmisi tuleks korrata. Kui uuritava kemikaaliga saadud väärtuste varieeruvus on suurem, kui on lubatud kindlaksmääratud vahemikus püsimiseks, tuleks sellega teha uus katse.

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimudel

33. Iga uuritava kemikaaliga saadud optilise tiheduse väärtuste alusel tuleks arvutada eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal negatiivse kontrolli puhul saadud väärtusest, mis on võetud võrdseks 100 protsendiga. HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamise korral arvutatakse eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul saadud MTT formasaani piigi pindala protsentuaalse osakaaluna paralleelse negatiivse kontrolliga saadud MTT formasaani piigi pindalast. Eluvõimeliste rakkude protsentuaalse osakaalu läviväärtused söövitavate uuritavate kemikaalide eristamiseks mittesöövitavatest (või söövitavate kemikaalide eri alamkategooriatesse liigitamiseks) on iga käesolevas katsemeetodis käsitletud katsemudeli jaoks sätestatud allpool punktides 35 ja 36 ning tulemuste tõlgendamisel tuleks kasutada just neid väärtusi.

34. Kui uuritava kemikaali liigitamisel saadakse ühene tulemus, piisab ühest mõõtmistsüklist, kus on kasutatud vähemalt kahte paralleelset koeproovi. Ebaselgete tulemuste puhul – näiteks kui paralleelproovidega saadud mõõtmisandmed lahknevad – võib kaaluda vajadust viia läbi veel üks mõõtmistsükkel ning esimeses kahes mõõtmistsüklis saadud tulemuste lahknevuse korral veel kolmaski mõõtmistsükkel.

35. Nahasöövituse katsemudeli EpiSkin™ puhul kasutatav prognoosimudel (9, 22, 34), mis on seotud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemiga, on esitatud tabelis 4.

▼M8

Tabel 4

Mudeli EpiSkin™ puhul kasutatav prognoosimudel

Kokkupuuteperioodi (t = 3, 60 või 240 minutit) järgselt mõõdetud eluvõimelisus	Kaalutav prognoos
< 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	**Söövitav:** • vabatahtlikult kohaldatavasse 1A alamkategooriasse liigitatav (*)
≥ 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit **NING** < 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 60 minutit **VÕI** ≥ 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 60 minutit **NING** < 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 240 minutit	**Söövitav:** • vabatahtlikult kohaldatavasse 1B ja 1C alamkategooriate ühiskategooriasse liigitatav
≥ 35 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 240 minutit	**Mittesöövitav**

(*) Andmetest, mis koguti selleks, et hinnata inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsemudelite kasutatavust alamkategooriatesse liigitamise toetamiseks, nähtub, et katsemudeliga EpiSkin™ saadud tulemuste alusel 1A alamkategooriasse liigitatud ainetest/segudest võib umbes 22 % kuuluda tegelikult 1B või 1C alamkategooriasse (st need on üleklassifitseeritud) (vt 3. liide).

36. Nahasöövituse katsemudelite EpiDerm™ SCT (10, 23, 35), SkinEthic™ RHE (17, 18, 23, 36) ja epiCS® (16, 23, 37) puhul kasutatavad prognoosimudelid, mis on seotud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemiga, on esitatud tabelis 5.

Tabel 5

Mudelite EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS® puhul kasutatavad prognoosimudelid

Kokkupuuteperioodi (t = 3 või 60 minutit) järgselt mõõdetud eluvõimelisus	Kaalutav prognoos
1. ETAPP mudelite EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS® puhul	
< 50 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	**Söövitav**
≥ 50 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit **NING** < 15 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 60 minutit	**Söövitav**
≥ 50 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit **NING** ≥ 15 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 60 minutit	**Mittesöövitav**
2. ETAPP mudeli EpiDerm™ SCT puhul – 1. etapis söövitavaks liigitatud ainete/segude puhul	
< 25 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1A alamkategooriasse liigitatav*
≥ 25 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1B ja 1C alamkategooriate ühiskategooriasse liigitatav
2. ETAPP mudeli SkinEthic™ RHE puhul – 1. etapis söövitavaks liigitatud ainete/segude puhul	
< 18 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1A alamkategooriasse liigitatav*

▼M8

Kokkupuuteperioodi (t = 3 või 60 minutit) järgselt mõõdetud eluvõimelisus	Kaalutav prognoos
1. ETAPP mudelite EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS® puhul	
≥ 18 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1B ja 1C alamkategooriate ühiskategooriasse liigitatav
2. ETAPP mudeli epiCS® puhul – 1. etapis söövitavaks liigitatud ainete/segude puhul	
< 15 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1A alamkategooriasse liigitatav*
≥ 15 % pärast kokkupuuteperioodi kestusega 3 minutit	Vabatahtlikult kohaldatavasse 1B ja 1C alamkategooriate ühiskategooriasse liigitatav

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

37. Iga katse puhul tuleks esitada tabeli kujul andmed iga paralleelse koeproovi kohta (näiteks optilise tiheduse väärtused ja eluvõimeliste rakkude protsentuaalne osakaal iga uuritava kemikaali puhul koos liigitamise tulemusega), sealhulgas vajaduse korral korduskatsete tulemused. Peale selle tuleks iga katse puhul esitada keskväärtused, eluvõimelisust kajastavate väärtuste vahemikud ja paralleelsete koeproovidega saadud andmete variatsioonikordajad. Iga asjaomase uuritava kemikaali puhul tuleks esitada andmed seoses MTT otsese redutseerija puhul täheldatud mõjuga MTT-le või värvilise uuritava kemikaali segava mõjuga.

Katseprotokoll

38. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollkemikaalid:

— ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— allikas ja partii number, kui see on olemas;

— vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);

— uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;

— säilitustingimused.

Kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel ja katse-eeskiri ning nende valimise põhjendus (vajaduse korral)

Katsetingimused:

— kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel (sealhulgas partii number);

▼**M8**

— mõõteseadme (nt spektrofotomeetri) kaliibrimisandmed, MTT formasaani kvantifitseerimiseks kasutatud lainepikkus ja filtri ribalaius (vajaduse korral) ning mõõteseadme lineaarsusvahemik;

— MTT formasaani kvantifitseerimiseks kasutatud meetodi kirjeldus;

— vajaduse korral HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteemi nõuetekohasuse tõendamise kirjeldus;

— kogu täiendav teave konkreetse kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli, sealhulgas selle kasutamise tulemuslikkuse kohta. See hõlmab vähemalt järgmisi aspekte:

i) eluvõimelisus;

ii) toimimine kaitsekihina;

iii) morfoloogia;

iv) reprodutseeritavus ja ennustusjõud;

v) mudeli kvaliteedi kontroll;

— viide varasematele andmetele mudeli kohta. See hõlmab vähemalt kvaliteedikontrolli andmete vastuvõetavust lähtuvalt varasematest andmetest partii kohta;

— pädevusainetega katsete tegemine eesmärgiga tõendada katsemeetodi kasutamise pädevust enne meetodi regulaarset rakendamist.

Katse käik:

— kasutatud katse-eeskirja üksikasjalik kirjeldus (sealhulgas teave kokkupuuteperioodi järgsete pesemisetappide kohta);

— kasutatud uuritava kemikaali ja kontrollkemikaalide annused;

— kokkupuuteperioodi(de) kestus ja kokkupuutetemperatuur(id);

— MTT otseste redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollid;

— iga uuritava kemikaali ja iga kontrolli (positiivse ja negatiivse kontrolli ning vajaduse korral NSMTT-kontrolli, NSC_{elus}-kontrolli ja/või $NSC_{surmatud}$-kontrolli) puhul iga kokkupuuteperioodi jaoks kasutatud paralleelsete koeproovide arv;

— kasutatud otsustuskriteeriumide/prognoosimudeli kirjeldus lähtuvalt kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelist;

— kõikide katsemeetodis tehtud (sealhulgas pesemisetappidega seotud) muudatuste kirjeldus.

Mõõtmistsüklis või katses saadavate tulemuste vastuvõetavuse kriteeriumid:

— varasemate andmete kohased positiivse ja negatiivse kontrolli puhul saadud keskväärtused ja vastuvõetavate väärtuste vahemikud;

— positiivse ja negatiivse kontrolli puhul paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvuse vastuvõetav määr;

▼**M8**

— uuritava kemikaali puhul paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvuse vastuvõetav määr.

Tulemused:

— tabeli kujul mõõtmisandmed iga uuritava kemikaali ja kontrolli kohta iga mõõtmistsükli, iga kokkupuuteperioodi ja iga paralleelproovi puhul, sealhulgas vastavalt vajadusele optilise tiheduse või MTT formasaani piigi pindala väärtused, eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal ja selle näitaja keskväärtus, paralleelproovide vahelise varieeruvuse andmed, standardhälbed ja/või variatsioonikordajad;

— vajaduse korral MTT otseste redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollidega saadud tulemused, sealhulgas vastavalt vajadusele optilise tiheduse või MTT formasaani piigi pindala väärtused, NSMTT(%), NSC_{elus} (%) ja/või $NSC_{surmatud}$ (%), paralleelsete koeproovide vahelise varieeruvuse andmed, standardhälbed ja/või variatsioonikordajad ning eluvõimeliste kudede lõplik korrigeeritud protsentuaalne osakaal;

— uuritava(te) kemikaali(de) ja kontrollkemikaalidega saadud tulemuste vastavus mõõtmistsüklis või katses saadavate tulemuste vastuvõetavuse kindlaksmääratud kriteeriumidele;

— muu täheldatud toime kirjeldus;

— klassifitseerimistulemused lähtuvalt kasutatud prognoosimudelist/otsustuskriteeriumidest.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) ÜRO (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Viies, täiendatud väljaanne. ÜRO, New York ja Genf. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Käesoleva lisa peatükk B.4 „Äge nahaärritus/-söövitus“.

(3) Käesoleva lisa peatükk B.40 „*In vitro* nahasöövitus: transkutaanse elektritakistuse (TET) mõõtmisel põhinev katsemeetod“.

(4) Käesoleva lisa peatükk B.65 „*In vitro* membraanibarjääri katsemeetod nahasöövituse uurimiseks“.

(5) Käesoleva lisa peatükk B.46 „*In vitro* nahaärritus: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.

(6) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., ja Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23: 219–255.

(8) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem J. H., Gerner I., Walker A. P., ja Worth, A. P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12: 471–482.

▼**M8**

(9) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H.-G., ja Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. In Vitro* 12: 483–524.

(10) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M., ja Holzhütter, H.-G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing. *ATLA* 28: 371–401.

(11) Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., ja Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23: 129–147.

(12) Alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (ICCVAM) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity). Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC10), 3. aprill 1998.

(15) ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC14), 21. märts 2000.

(16) Hoffmann, J., Heisler, E., Karpinski, S., Losse, J., Thomas, D., Siefken, W., Ahr, H. J., Vohr. H. W., ja Fuchs, H. W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000) – A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925–929.

(17) Kandárová, H., Liebsch, M., Spielmann, H., Genschow, E., Schmidt, E., Traue, D., Guest, R., Whittingham, A., Warren, N., Gamer, A. O., Remmele, M., Kaufmann, T., Wittmer, E., De Wever, B., ja Rosdy, M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547–559.

(18) Tornier, C., Roquet, M., ja Fraissinette, A. B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379–1385.

(19) ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC25), 17. november 2006.

(20) ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC30), 12. juuni 2009.

▼**M8**

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 190. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(22) Alépée, N., Grandidier, M. H., ja Cotovio, J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28: 131–145.

(23) Desprez, B., Barroso, J., Griesinger, C., Kandárová, H., Alépée, N., ja Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29: 2055–2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion Testing as described in TG 431. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 219. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(26) Eskes, C., *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62: 393–403.

(27) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55–63.

(28) Tinois, E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human Epidermis *In Vitro*. Väljaandes: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier, A., Goldberg, A. M., ja Maibach, H. I. (toim.). Lk 133–140.

(29) Cannon, C. L., Neal, P. J., Southee, J. A., Kubilus, J., ja Klausner, M. (1994). New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. In Vitro* 8: 889–891.

(30) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Bouwstra, J., ja Mommaas, M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Int. J. Pharm.* 203: 211–225.

(31) Tinois, E., Tiollier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M., ja Thivolet, J. (1991). *In Vitro* and Post-Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193: 310–319.

(32) Parenteau, N. L., Bilbo, P., Nolte, C. J., Mason, V. S., ja Rosenberg, M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotechnology* 9: 163–171.

(33) Wilkins, L. M., Watson, S. R., Prosky, S. J., Meunier, S. F., ja Parenteau, N. L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotechnol. Bioeng.* 43(8): 747–756.

(34) Standardne töökord mudeli EpiSkin™ jaoks (detsember 2011). Andmebaasi *INVITTOX* katse-eeskiri nr 118 „EpiSkin™ Skin Corrosivity Test“.

(35) Standardne töökord mudeli EpiDerm™ jaoks (veebruar 2012). Versioon MK-24-007-0024. Katse-eeskiri „*In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT). For Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm™“.

▼**M8**

(36) Standardne töökord mudeli SkinEthic™ RHE jaoks (jaanuar 2012). Andmebaasi *INVITTOX* katse-eeskiri „SkinEthic™ Skin Corrosivity Test“.

(37) Standardne töökord mudeli EpiCS® jaoks (jaanuar 2012). Versioon 4.1. *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test: Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., ja McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741–761.

(39) USA Toidu- ja Ravimiamet (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. USA tervishoiu- ja sotsiaalteenuste ministeerium, Toidu- ja Ravimiamet (mai 2001). Kättesaadav aadressil [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼M8

1. liide

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (25).

ET_{50} – näitaja, mille hinnangulise väärtuse leidmiseks tehakse kindlaks kokkupuuteperiood, mille jooksul rakkude eluvõimelisus väheneb teatava kindlaksmääratud kontsentratsiooniga võrdluskemikaaliga töötlemise tagajärjel 50 % võrra; vt ka mõistet IC_{50}.

GHS (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavituselemente nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (1).

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

IC_{50} – näitaja, mille hinnangulise väärtuse leidmiseks tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures võrdluskemikaal vähendab teatava kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kudede eluvõimelisust 50 % võrra; vt ka mõistet ET_{50}.

***In vivo** nahasöövitus* – pöördumatu nahakahjustuse tekkimine, st läbi marrasknaha pärisnahani ulatuva nähtava nekroosi tekkimine pärast uuritava kemikaali pealekandmist kuni neljaks tunniks. Tüüpilised söövitusnähud on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

Kemikaal – aine või segu.

Lõpmata suur annus – marrasknahale kantud uuritava kemikaali kogus, mis on suurem kui marrasknaha pinna täielikuks ja ühtlaseks katmiseks vajalik kogus.

Mitmest koostisosast koosnev aine – – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on suurem kui 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokkusegamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MS – mittesöövitav.

MTT – 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülsinise tetrasooliumbromiid.

▼M8

Mõõtmistsükkel – ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine negatiivse ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

NSC_{elus}-kontroll – eluskudede mittespetsiifilist värvumist kajastav kontroll.

$NSC_{surmatud}$-kontroll – surmatud kudede mittespetsiifilist värvumist kajastav kontroll.

NSMTT – MTT mittespetsiifiline redutseerumine.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud kemikaaliga, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Rakkude eluvõimelisus – näitaja, mis väljendab rakupopulatsiooni summaarset aktiivsust, näiteks raku mitokondri dehüdrogenaaside võimet redutseerida vitaalvärvainet MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülsinine), ning mis olenevalt mõõdetavast lõppnäitajast ja kasutatavast katseplaanist korreleerub elusrakkude üldarvu ja/või elujõulisusega.

Segu – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus, mille koostisained ei reageeri üksteisega.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (25).

Tulemuslikkuse standardid – valideeritud katsemeetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse mehhanismilt ja tööpõhimõttelt sarnase kavandatud katsemeetodi võrreldavust. Need hõlmavad: i) katsemeetodi olulisi elemente, ii) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja iii) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel (25).

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (25).

Täpsus – katsemeetodiga saadud tulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (25).

UPLC – ülikõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (25).

▼**M8**

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Vastavus – katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategoriseeritav tulemus; üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse mõnikord täpsuse tähenduses ja see on määratletud kui õigesti positiivseks või negatiivseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide uuritud kemikaalide seas. Vastavus sõltub väga suurel määral positiivsete tulemuste osakaalust uuritavale kemikaalile vastavat liiki kemikaalide hulgas (25).

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

▼M8

2. liide

NAHASÖÖVITUSE HINDAMISEKS VALIDEERITUD INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHA KATSEMUDELITE PÕHIELEMENDID

Katsemudeli elemendid	EpiSkin™	EpiDerm™SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Mudeli pindala	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Paralleelsete koeproovide arv	Vähemalt 2 iga kokkupuuteperioodi kohta	2–3 iga kokkupuuteperioodi kohta	Vähemalt 2 iga kokkupuuteperioodi kohta	Vähemalt 2 iga kokkupuuteperioodi kohta
Töötlemisel kasutatavad annused ja pealekandmine	Vedelikud ja viskoossed kemikaalid: 50 ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Tahked kemikaalid: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 ± 5µl NaCl lahust (9 g/l) Vahajad/kleepuvad kemikaalid: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) nailonvõrgu abil	Vedelikud: 50 µl (79,4 µl/cm^2) nailonvõrgu abil või ilma selleta *Eelkatsega kontrollitakse, kas uuritav kemikaal sobib kasutamiseks koos nailonvõrguga* Pooltahked kemikaalid: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Tahked kemikaalid: 25 µl H_2O (või vajaduse korral rohkem) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vahad: koe pinnale, mida on niisutatud 15 µl H_2O-ga, asetatakse lame ketasjas tükk läbimõõduga umbes 8 mm	Vedelikud ja viskoossed kemikaalid: 40 ± 3µl (80 µl/cm^2) nailonvõrgu abil *Eelkatsega kontrollitakse, kas uuritav kemikaal sobib kasutamiseks koos nailonvõrguga* Tahked kemikaalid: 20 ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Vahajad/kleepuvad kemikaalid: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) nailonvõrgu abil	Vedelikud: 50 µl (83,3 µl/cm^2) nailonvõrgu abil *Eelkatsega kontrollitakse, kas uuritav kemikaal sobib kasutamiseks koos nailonvõrguga* Pooltahked kemikaalid: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Tahked kemikaalid: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (või vajaduse korral rohkem) Vahajad kemikaalid: koe pinnale, mida on niisutatud 15 µl H_2O-ga, asetatakse lame küpsisekujuline tükk läbimõõduga umbes 8 mm
Eelkontroll MTT otsese redutseerimise suhtes	50 µl (vedelikud) või 20 mg (tahkised)+ 2 ml MTT lahust (0,3 mg/ml); inkubeeritakse 180 ± 5 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks kasutada veega surmatud kohandatud kontrollkudesid	50 µl (vedelikud) või 25 mg (tahkised)+ 1 ml MTT lahust (1 mg/ml); inkubeeritakse 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks kasutada külmutamise teel surmatud kohandatud kontrollkudesid	40 µl (vedelikud) või 20 mg (tahkised)+ 1 ml MTT lahust (1 mg/ml); inkubeeritakse 180 ± 15 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks kasutada külmutamise teel surmatud kohandatud kontrollkudesid	50 µl (vedelikud) või 25 mg (tahkised)+ 1 ml MTT lahust (1 mg/ml); inkubeeritakse 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks kasutada külmutamise teel surmatud kohandatud kontrollkudesid

▼M8

Katsemudeli elemendid	EpiSkin™	EpiDerm™SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Eelkontroll värvusest tuleneva segava mõju suhtes	10 µl (vedelikud) või 10 mg (tahkised) + 90 µl H_2O; inkubeeritakse segamisega 15 minutit toatemperatuuril → Kui lahus värvub, tuleks kasutada kohandatud kontrollina eluskudesid	50 µl (vedelikud) või 25 mg (tahkised) + 300 µl H_2O; inkubeeritakse 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus värvub, tuleks kasutada kohandatud kontrollina eluskudesid	40 µl (vedelikud) või 20 mg (tahkised) + 300 µl H_2O; inkubeeritakse segamisega 60 minutit toatemperatuuril → Kui uuritav kemikaal on värviline, tuleks kasutada kohandatud kontrollina eluskudesid	50 µl (vedelikud) või 25 mg (tahkised) + 300 µl H_2O; inkubeeritakse 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 % → Kui lahus värvub, tuleks kasutada kohandatud kontrollina eluskudesid
Kokkupuuteperioodid ja -temperatuurid	3 minutit, 60 minutit (± 5 minutit) ja 240 minutit (± 10 minutit) ventileeritud kapis toatemperatuuril (18–28 °C)	3 minutit toatemperatuuril ja 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 %	3 minutit toatemperatuuril ja 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 %	3 minutit toatemperatuuril ja 60 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 %
Loputamine	25 ml 1 x PBS-ga (2 ml loputuskorra kohta)	20 korda 1 x PBS-i katkematu nõrga joa all	20 korda 1 x PBS-i katkematu nõrga joa all	20 korda 1 x PBS-i katkematu nõrga joa all
Negatiivne kontroll	50 µl NaCl lahust (9 g/l) Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul	50 µl H_2O Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul	40 µl H_2O Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul	50 µl H_2O Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul
Positiivne kontroll	50 µl jää-äädikhapet Kasutatakse üksnes neljatunnisel inkubeerimisel	50 µl 8 N KOH Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul	40 µl 8 N KOH Kasutatakse üksnes ühetunnisel inkubeerimisel	50 µl 8 N KOH Kasutatakse iga kokkupuuteperioodi puhul
MTT lahus	2 ml kontsentratsiooniga 0,3 mg/ml	300 µl kontsentratsiooniga 1 mg/ml	300 µl kontsentratsiooniga 1 mg/ml	300 µl kontsentratsiooniga 1 mg/ml
MTT-ga inkubeerimise aeg ja temperatuur	180 minutit (± 15 minutit) 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 %	180 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 %	180 minutit (± 15 minutit) 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 %	180 minutit 37 °C juures atmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 ja mille suhteline niiskus on 95 %

▼M8

Katsemudeli elemendid	EpiSkin™	EpiDerm™SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Ekstraheerimislahusti	500 µl hapestatud isopropanooli (0,04 N HCl isopropanoolis) (eraldatud kude on lahusega täielikult kaetud)	2 ml isopropanooli (ekstraheeritakse inserdi üla- ja alapoolelt)	1,5 ml isopropanooli (ekstraheeritakse inserdi üla- ja alapoolelt)	2 ml isopropanooli (ekstraheeritakse inserdi üla- ja alapoolelt)
Ekstraheerimisperiood ja -temperatuur	Öö läbi toatemperatuuril valguse eest kaitstuna	Loksutamiseta öö läbi toatemperatuuril või loksutamisega (~120 pööret minutis) 120 minutit toatemperatuuril	Loksutamiseta öö läbi toatemperatuuril või loksutamisega (~120 pööret minutis) 120 minutit toatemperatuuril	Loksutamiseta öö läbi toatemperatuuril või loksutamisega (~120 pööret minutis) 120 minutit toatemperatuuril
Optilise tiheduse mõõtmine	570 nm (545–595 nm), võrdlusfiltrita	570 nm (või 540 nm), võrdlusfiltrita	570 nm (540–600 nm), võrdlusfiltrita	540–570 nm, võrdlusfiltrita
Kudede kvaliteedikontroll	18-tunnine töötlus SDS-ga 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Töötlemine 1 % Triton X-100-ga 4,08 tundi ≤ ET_{50} ≤ 8,7 tundi	Töötlemine 1 % Triton X-100-ga 4,0 tundi ≤ ET_{50} ≤ 10,0 tundi	Töötlemine 1 % Triton X-100-ga 2,0 tundi ≤ ET_{50} ≤ 7,0 tundi
Katse nõuetekohasuse kriteeriumid	1. Negatiivse kontrolliga (NaCl) töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud optilise tiheduse keskväärtus peaks iga kokkupuuteperioodi puhul jääma vahemikku 0,6–1,5 2. Positiivse kontrolliga (jää-äädikhape) 4 tunni vältel töödeldud paralleelsetes koeproovides täheldatud eluvõimelisuse keskväärtus, väljendatuna protsentuaalse osakaaluna negatiivse kontrolliga saadud väärtusest, peaks olema ≤ 20 % 3. Kahes paralleelses koeproovis täheldatud eluvõimelisuse erinevus ei tohiks eluvõimelisuse vahemikus 20–100 % ja optilise tiheduse väärtustel ≥ 0,3 olla suurem kui 30 %	1. Negatiivse kontrolliga (H_2O) töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud optilise tiheduse keskväärtus peaks iga kokkupuuteperioodi puhul jääma vahemikku 0,8–2,8 2. Positiivse kontrolliga (8 N KOH) 1 tunni vältel töödeldud paralleelsetes koeproovides täheldatud eluvõimelisuse keskväärtus, väljendatuna protsentuaalse osakaaluna negatiivse kontrolliga saadud väärtusest, peaks olema < 15 % 3. Paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste variatsioonikordaja peaks eluvõimelisuse vahemikus 20–100 % olema ≤ 30 %	1. Negatiivse kontrolliga (H_2O) töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud optilise tiheduse keskväärtus peaks iga kokkupuuteperioodi puhul jääma vahemikku 0,8–3,0 2. Positiivse kontrolliga (8 N KOH) 1 tunni vältel (ja vajaduse korral 4 tunni vältel) töödeldud paralleelsetes koeproovides täheldatud eluvõimelisuse keskväärtus, väljendatuna protsentuaalse osakaaluna negatiivse kontrolliga saadud väärtusest, peaks olema < 15 % 3. Kahes paralleelses koeproovis täheldatud eluvõimelisuse erinevus ei tohiks eluvõimelisuse vahemikus 20–100 % ja optilise tiheduse väärtustel ≥ 0,3 olla suurem kui 30 %	1. Negatiivse kontrolliga (H_2O) töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud optilise tiheduse keskväärtus peaks iga kokkupuuteperioodi puhul jääma vahemikku 0,8–2,8 2. Positiivse kontrolliga (8 N KOH) 1 tunni vältel töödeldud paralleelsetes koeproovides täheldatud eluvõimelisuse keskväärtus, väljendatuna protsentuaalse osakaaluna negatiivse kontrolliga saadud väärtusest, peaks olema < 20 % 3. Kahes paralleelses koeproovis täheldatud eluvõimelisuse erinevus ei tohiks eluvõimelisuse vahemikus 20–100 % ja optilise tiheduse väärtustel ≥ 0,3 olla suurem kui 30 %

▼**M8**

3. liide

KATSEMUDELITE USALDUSVÄÄRSUS ALAMKATEGOORIATESSE LIIGITAMISEL

Allpool tabelis on esitatud kõnealust nelja katsemudelit iseloomustavad tulemusnäitajad, mis on arvutatud lähtuvalt nende mudelite väljatöötajate katseandmetest 80 analüüsitud kemikaali kohta Arvutused on teinud OECD sekretariaat ning need on läbi vaadanud ja heaks kiitnud asjaomane ekspertide allrühm (21, 23).

Katsemudelid EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ ja epiCS® võimaldavad liigitamist alamkategooriatesse (st 1A alamkategooriasse, 1B ja 1C ühiskategooriasse ning mittesöövitavaks).

Nimetatud nelja katsemudelit iseloomustavad tulemusnäitajad, üleklassifitseerimise ja alaklassifitseerimise määrad ning täpsus (ennustusjõud), mis põhinevad andmetel 80 kemikaali kohta, millest igaühte on iga katsemudeli puhul analüüsitud 2 või 3 mõõtmistsüklis, on järgmised.

STATISTILISED ANDMED KÕIKIDE ANALÜÜSITUD KEMIKAALIDE PUHUL TEHTUD PROGNOOSIDE KOHTA

(80 kemikaali analüüsiti mudeli epiCS® puhul 2 sõltumatus mõõtmistsüklis ning mudelite EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ ja SkinEthic™ RHE puhul 3 sõltumatus mõõtmistsüklis, st saadi vastavalt 159 (*) või 240 liigitamistulemust)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Üleklassifitseerimine:				
1B ja 1C ühiskategooria kemikaali üleklassifitseerimine 1A alamkategooriasse	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
MS kemikaali üleklassifitseerimine 1B ja 1C ühiskategooriasse	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
MS kemikaali üleklassifitseerimine 1A alamkategooriasse	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Söövitavaks kemikaaliks üleklassifitseerimine	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Üldine üleklassifitseerimise määr (kõikide kategooriate lõikes)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Alaklassifitseerimine:				
1A alamkategooria kemikaali alaklassifitseerimine 1B ja 1C ühiskategooriasse	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A alamkategooria kemikaali alaklassifitseerimine MS-ks	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B ja 1C ühiskategooria kemikaali alaklassifitseerimine MS-ks	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Üldine alaklassifitseerimise määr (kõikide kategooriate lõikes)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Õigesti liigitamine:				
Õigesti liigitamine 1A alamkategooriasse	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Õigesti liigitamine 1B ja 1C ühiskategooriasse	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Õigesti liigitamine MS-ks	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Üldine täpsus	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

MS – mittesöövitav

(*) Ühte kemikaali analüüsiti mudeli epiCS® puhul vaid korra, kuna see ei olnud enam kättesaadav (23)

▼**M8**

4. liide

HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteemi nõuetekohasuse kriteeriumid ja põhinäitajad inimese rekonstrueeritud marrasknahast ekstraheeritud MTT formasaani määramise võimaldamiseks

Näitaja	USA Toidu- ja Ravimiameti suunistel põhinev katse-eeskiri (37, 38)	Nõuetekohasuse kriteeriumid
Selektiivsus	Isopropanooli, eluskudede tühiproovi (isopropanooliekstrakt inimese rekombineeritud marrasknaha eluskudedest, mida ei ole ühelgi viisil töödeldud) ja surmatud kudede tühiproovi (isopropanooliekstrakt inimese rekombineeritud marrasknaha surmatud kudedest, mida ei ole ühelgi viisil töödeldud) analüüsimine	Segavale signaalile vastav pindala on ≤ 20 % LLOQ-le ([1]) vastavast pindalast
Kordustäpsus	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused (st MTT formasaan kontsentratsioonis 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanoolis (n = 5)	Variatsioonikordaja on LLOQ puhul ≤ 15 % või ≤ 20 %
Mõõtetäpsus	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 5)	Hälve on ≤ 15 % või LLOQ puhul ≤ 20 %
Maatriksiefekt	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskudede tühiproovis (n = 5)	85 % ≤ maatriksiefekt ≤ 115 %
Ülekandumine	Isopropanooli analüüsimine pärast ULOQ[2] puhul kasutatavat standardit ([2])	Segavale signaalile vastav pindala on ≤ 20 % LLOQ-le vastavast pindalast
Reprodutseeritavus (samal päeval)	3 sõltumatut kaliibrimiskõverat, mis põhinevad MTT formasaani kuuel järjestikusel 1: 3 lahjendusel isopropanoolis alates ULOQ-st, st kontsentratsioonist 200 µg/ml; kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 5)	Kaliibrimiskõverad: hälve on ≤ 15 % või LLOQ puhul ≤ 20 % Kvaliteedikontrolli proovid: hälve on ≤ 15 % ja variatsioonikordaja ≤ 15 %
Reprodutseeritavus (eri päevade lõikes)	1. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 3) 2. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 3) 3. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 3)	
MTT formasaani lühiajaline püsivus inimese rekonstrueeritud marrasknaha koeekstraktis	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskudede tühiproovis (n = 3); analüüsitakse valmistamise päeval ja pärast 24-tunnist toatemperatuuril säilitamist	Hälve on ≤ 15 %
MTT formasaani pikaajaline püsivus inimese rekonstrueeritud marrasknaha koeekstraktis (vajaduse korral)	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskudede tühiproovis (n = 3); analüüsitakse valmistamise päeval ja pärast mitmepäevast säilitamist kindlaksmääratud temperatuuril (nt 4°C, –20°C, –80°C)	Hälve on ≤ 15 %

([1]) LLOQ – alumine määramispiir, mis määratluse kohaselt vastab kudede eluvõimelisuse määrale 1–2 %; st 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ – ülemine määramispiir, millele vastav kontsentratsioon on määratluse kohaselt vähemalt kaks korda suurem kui MTT formasaani suurim eeldatav kontsentratsioon negatiivsetest kontrollproovidest saadud isopropanooliekstraktides; st 200 µg/ml. [[G1]]

▼B

B.41. ***IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOKSILISUSE KATSE**

1. **MEETOD**

Käesolev meetod vastab suunisele OECD TG 432 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Fototoksilisust määratletakse kui kehale kantud aine toksilist reaktsiooni, mis tekib või (madalama doosi puhul) ägeneb pärast järgnevat kokkupuudet valguskiirgusega või mille kutsub esile naha kiiritamine pärast aine süsteemset manustamist.

In vitro 3T3 NRU fototoksilisuse katset kasutatakse selleks, et teha kindlaks kokkupuutel valgusega ergastanud uuritava aine fototoksilisus. Katsega hinnatakse fotosütotoksilisust: kuivõrd sõltub rakkude eluvõime vähenemine kemikaaliga kokkupuutumisel sellest, kas see toimub valguse käes või pimedas. Selles katses positiivseks osutunud ained on tõenäoliselt fototoksilised *in vivo* pärast süsteemset manustamist ja naha sisse jõudmist või pärast paikset kasutamist.

Fototoksiline mõju on leitud paljudel kemikaaliliikidel (viited 1–4). Nende ühine omadus on võime neelata valgusenergiat päikesevalguse lainepikkustel. Fotokeemia esimese seaduse (Grotthausi-Draperi seadus) kohaselt on fotoreaktsiooni toimumiseks vajalik piisava hulga valguskvantide neeldumine. Seepärast tuleb enne bioloogilise katse sooritamist määrata uuritava kemikaali UV ja nähtava valguse neeldumisspekter vastavalt OECD katsejuhendile 101. Väidetakse, et kui molaarse ekstinktsiooni/neeldumise koefitsient on väiksem kui 10 $l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$, ei ole kemikaal tõenäoliselt valgustundlik. Sellisele kemikaalile ei ole vaja teha *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katset või muud bioloogilist katset kahjuliku fotokeemilise toime kindlakstegemiseks (1 ja 5). Vt ka lisa 1.

Hiljuti hinnati *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katse usaldusväärsust ja asjakohasust (6–9). Näidati, et *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katsega saab prognoosida ägedat fototoksilist reaktsiooni loomadel ja inimestel *in vivo.* Katse eesmärk ei ole prognoosida muid kahjulikke toimeid, mis võivad ilmneda kemikaali ja valguse koostoimel, nagu fotogenotoksilisus, fotoallergia või fotokantserogeensus, samuti ei võimalda see hinnata fototoksilist potentsiaali. Lisaks ei ole katse ette nähtud fototoksilisuse kaudsete mehhanismide, uuritava aine metaboliitide mõju või segude mõju kontrollimiseks.

Kuigi kõigi genotoksilise ja kantserogeense potentsiaali ennustamiseks tehtavate *in vitro* katsete korral on üldiselt nõutav metaboliseeriva süsteemi kasutamine, on seni vähe näiteid, kus kemikaali *in vivo* või *in vitro* fototoksilise toime avaldumiseks on vaja metaboolset transformatsiooni. Seega ei peeta vajalikuks ega teaduslikult põhjendatuks, et käesolevat katset tuleks läbi viia metaboolse aktiveerimissüsteemi abil.

▼B

1.2. MÕISTED

Kiiritustihedus – pinnale langeva ultraviolett- (UV) või nähtava valguse intensiivsus, mida mõõdetakse ühikutes W/m^2 või W/cm^2.

Kiiritusannus – pinnale langeva ultraviolett- või nähtava kiirguse hulk (s.o intensiivsus × aeg), mida väljendatakse džaulides (Ws) pinnaühiku kohta, näiteks $\mathbf{J/m^2}$ või J/cm^2.

UV-valguse lainealad – CIE (Rahvusvaheline Valgustuskomisjon) soovitatud tähistused on järgmised: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) ja UVC (100–280 nm). Kasutatakse ka teisi nimetusi; piiriks UVB ja UVA vahel võetakse sageli 320 nm ja UVA võib jagada aladeks UV-A1 ja UV-A2 piiriga umbes 340 nm juures.

Rakkude eluvõimelisus – rakupopulatsiooni üldist aktiivsust (näiteks vitaalvärvi neutraalpunase neeldumist raku lüsosoomidesse) väljendav parameeter, mis olenevalt mõõdetavast muutujast ja katseplaanist korreleerub rakkude koguarvu ja/või vitaalsusega.

Rakkude suhteline eluvõimelisus – rakkude eluvõimelisus, mida väljendatakse lahusti (negatiivsete) kontrollproovide suhtes, millega tehakse läbi kogu katse (kas +Irr või –Irr), välja arvatud uuritava kemikaaliga töötlemine.

PIF (*Photo-Irritation-Factor* – fotoärrituvustegur) – tegur, mis põhineb sellel, et võrreldakse uuritava kemikaali kahte võrdselt tsütotoksilist kontsentratsiooni (IC_{50}): valguse puudumisel (–Irr) ja kiiritamisel mittetsütotoksilise UVA või nähtava valgusega (+Irr).

IC_{50} – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis vähendab rakkude elujõulisust 50 %.

MPE *(Mean-Photo-Effect* – keskmine fotoefekt) – mõõdetav suurus, mis saadakse kontsentratsiooni-mõju sõltuvuste matemaatilise analüüsiga, võrreldes mõju valguse puudumisel (–Irr) ja kiiritamisel mittetsütotoksilise UVA või nähtava valgusega (+Irr).

Fototoksilisus – äge toksiline reaktsioon, mis tekib pärast naha kokkupuudet teatava kemikaaliga ja sellele järgnevat kiiritamist või mida sarnasel viisil tekitab naha kiiritamine pärast kemikaali süsteemset manustamist.

1.3. MEETODI PÕHIMÕTE

In vitro 3T3 NRU fototoksilisuse katses võrreldakse kemikaali tsütotoksilisust pimeduses ja päikesevalgusele samase valguse mittetsütotoksilise annusega kiiritamisel. Tsütotoksilisus avaldub käesolevas katses vitaalvärvi neutraalpunase rakkudes neeldumise vähenemisena, sõltuvalt uuritava aine kontsentratsioonist; seda mõõdetakse 24 tundi pärast uuritava kemikaaliga töötlemist ja kiiritamist (10). Neutraalpunane on nõrk katioonne värvaine, mis tungib mittedifusioonilisel teel kergesti läbi rakumembraani ja koguneb rakus lüsosoomidesse. Tundliku lüsosoomimembraani muutused muudavad lüsosoomid hapraks ja põhjustavad muid muutusi, mis lõpuks osutuvad pöördumatuks. Sellised võõrainete toimel tekkivad muutused vähendavad neutraalpunase neelamist ja sidumist. Nii saab eristada elujõulisi, kahjustatud ja surnud rakke, mis ongi käesoleva katse aluseks.

▼B

Monokihtide saamiseks hoitakse Balb/c 3T3 rakke 24 tundi kasvukeskkonnas. Kaht 96 süvendiga plaati uuritava kemikaali kohta inkubeeritakse uuritava aine kaheksa kontsentratsiooniga 1 tunni vältel. Seejärel kiiritatakse üht kahest plaadist kõrgeima mittetsütotoksilise kiirituse kogusega, samas kui teist plaati hoitakse pimedas. Seejärel asendatakse mõlemal plaadil töötlemiskeskkond kasvukeskkonnaga ja pärast edasist 24tunnist inkubeerimist määratakse raku elujõulisus kindlaks neutraalpunase neeldumise kaudu. Rakkude elujõulisus väljendatakse protsendina uuritava ainega töötlemata, kuid lahustit sisaldavate kontrollproovide suhtes ning see arvutatakse uuritava aine iga kontsentratsiooni puhul. Fototoksilise potentsiaali prognoosimiseks võrreldakse kontsentratsiooni-mõju sõltuvusi, mis on saadud pimedas hoitud ja valgusega kiiritatud katsetes, tavaliselt IC_{50} tasemel, st kontsentratsiooni kaudu, mis vähendab raku eluvõimelisust 50 %, võrreldes uuritava ainega töötlemata kontrollproovidega.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Ettevalmistused**

1.4.1.1. *Rakud*

Valideerimisel kasutati hiire fibroblasti püsivat rakuliini Balb/c 3T3, kloon 31, mis pärines kas USA kollektsioonist (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) või Euroopa kollektsioonist (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK), ning rakuliin soovitatakse hankida hea tasemega rakuhoidlast. Uurimiseks võib kasutada teisi rakke või rakuliine, kui kasvatamistingimused kohandatakse rakkude erivajadustele, kuid siis on vaja tõendada tulemuste samaväärsust.

Rakke tuleks regulaarselt kontrollida mükoplasma nakkuse suhtes ja kasutada vaid siis, kui seda ei esine (11).

On oluline, et rakkude UV-tundlikkust kontrollitakse regulaarselt vastavalt käesolevas metoodikas kirjeldatud kvaliteedikontrolli eeskirjale. Kuna rakud võivad passaažide arvu suurenemisega muutuda UVA-tundlikumaks, tuleks kasutada Balb/c 3T3 rakke, mille passaažide arv on võimalikult väike, eelistatavalt alla 100 (vt punkti 1.4.2.2.2 ja 2. lisa).

1.4.1.2. *Kasvukeskkonnad ja kultiveerimistingimused*

Rutiinseks rakupassaažiks ja mõõtmiste ajal tuleb kasutada sobivat kasvukeskkonda ja inkubeerimistingimusi, näiteks Balb/c 3T3 rakkude puhul on need DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), millele on lisatud 10 % vastsündinud vasika seerumit, 4 mM glutamiini, penitsilliini (100 IU) ja streptomütsiini (100 µg/ml), ning niisutatud inkubatsioon 37 °C ja 5–7,5 % CO_2 juures, olenevalt puhvrist (vt punkti 1.4.1.4 teist lõiku). On väga oluline, et rakukultuuri tingimustega oleks tagatud rakkude olek rakutsükli perioodis, mis on kasutatavate rakkude või kasutatava rakuliini jaoks normaalses ajaloolises vahemikus.

1.4.1.3. *Kultuuride ettevalmistamine*

Külmutatud varukultuuridest pärit rakud külvatakse kasvukeskkonda sobiva tihedusega ja külvatakse ümber vähemalt korra, enne kui neid kasutatakse *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses.

▼B

Fototoksilisuse katses kasutatavad rakud külvatakse kasvukeskkonda sobiva tihedusega, nii et kultuurid ei laatu katse lõpuks, st selleks ajaks, kui 48 tundi pärast rakkude külvamist määratakse rakkude elujõulisust. Rakkude Balb/c 3T3 kasvatamisel 96 süvendiga plaatidel on soovitatav külvamistihedus 1×10^4 rakku süvendi kohta.

Igas kemikaali uurimise katses külvatakse rakud ühtemoodi kahele eraldi 96 süvendiga plaadile, mida hoitakse seejärel kogu katse ajal ühesugustes kasvutingimustes, välja arvatud ajavahemik, mil üht plaati kiiritatakse (+Irr) ja teist hoitakse pimedas (–Irr).

1.4.1.4 *Uuritava aine ettevalmistamine*

Uuritav aine peab olema valmistatud vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui andmed näitavad, et aine on hoidmisel püsiv. Soovitav on kemikaale käsitseda ja rakke esialgselt töödelda sellistes valgustustingimustes, et uuritava aine fotoaktivatsioon või lagunemine enne kiiritamist oleks välistatud.

Uuritavad kemikaalid lahustatakse puhvriga soolalahuses, näiteks Earle'i tasakaalustatud soolalahuses (EBSS: *Earle's Balanced Salt Solution)* või muus füsioloogiliselt tasakaalustatud puhvri lisandiga soolalahuses, mis ei tohi sisaldada valke, valgust neelavaid komponente (näit pH-indikaatorvärvid ja vitamiinid), mis võiksid segada kiiritamist. Kuna kiiritamise ajal hoitakse rakke umbes 50 minutit CO_2-inkubaatorist väljas, tuleb olla ettevaatlik, et ei toimuks leelistumist. Nõrga puhvri nagu EBSSi kasutamisel saab leelistumist vältida rakkude inkubeerimisega 7,5 % CO_2 juures. Kui rakke inkubeeritakse kõigest 5 % CO_2 juures, tuleks valida tugevam puhver.

Halvasti vees lahustuvad uuritavad kemikaalid tuleks lahustada sobivas lahustis. Lahusti kasutamisel peab seda olema ühesugune kogus kõikides kultuurides, st nii negatiivsetes (lahusti) kontrollkatsetes kui ka uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni juures, ja lahusti kasutatav kontsentratsioon ei tohi olla tsütotoksiline. Uuritava kemikaali kontsentratsioon tuleb valida nii, et aine ei sadeneks ja et lahuses ei tekiks hägu.

Lahustina soovitatakse kasutada dimetüülsulfoksiidi (DMSO) või etanooli (ETOH). Võib kasutada ka muid madala tsütotoksilisusega lahusteid. Enne kasutamist tuleb hinnata iga lahusti sobivust, arvestades lahusti konkreetseid omadusi, näiteks reageerimine uuritava kemikaaliga, fototoksilise toime nõrgendamine, radikaalide sidumine ja/või kemikaali stabiilsus lahustis.

Lahustamise hõlbustamiseks võib kasutada keerissegamist, ultraheliga töötlemist ja/või soojendamist sobiva temperatuurini, kui see ei mõjuta uuritava kemikaali stabiilsust.

▼B

1.4.1.5 *Kiiritamise tingimused*

1.4.1.5.1. Valgusallikas

Sobiva valgusallika ja filtrite valimine on fototoksilisuse katse puhul ülioluline tegur. UVA ja nähtav valgus on tavaliselt seotud fototoksiliste reaktsioonidega *in vivo* (3 ja 12), samas kui UVB on üldiselt vähem oluline; UVB on aga väga tsütotoksiline – lainepikkuse vahemikus 313–280 nm suureneb tsütotoksilisus 1 000 korda (viide 13). Sobiva valgusallika valimise kriteeriumid peavad hõlmama nõuet, et valgusallikas kiirgaks lainepikkusi, mis neelduvad uuritavas kemikaalis (neeldumisspekter), ja et (mõistliku aja jooksul saavutatav) kiiritusannus oleks piisav tuntud fototsütotoksiliste kemikaalide avastamiseks. Lisaks ei tohi kasutatav lainepikkus ja kiiritusannus liigselt kahjustada katsesüsteemi, näit soojuse eraldumise tõttu (infrapunapiirkond).

Sobivaimaks tehisvalguse allikaks peetakse päikesevalgust järgiaimavat „kunstlikku päikest". „Kunstliku päikese" kiirguse intensiivsuse jaotumine pärast filtrimist peaks olema lähedane päikesevalguse omale vabas looduses (14). „Kunstliku päikesena" kasutatakse nii ksenoonkaarlampe kui (dopeeritud) elavhõbe-metallhalogeniid-kaarlampe (15). Viimaste eelis on nõrgem soojuskiirgus ja odavus, kuid nende valgus ei ole päikesevalgusega nii sarnane kui ksenoonkaarlambi oma. Kuna kõik „kunstlikud päikesed" kiirgavad palju UVBd, tuleks nende valgust filtrida, et vähendada ülimalt tsütotoksilist UVB-lainepikkusega kiirgust. Kuna rakukultuuri plastmaterjalid sisaldavad UV-stabilisaatoreid, tuleks spektrit mõõta läbi 96 süvendiga plaadi kaane, mis on sama tüüpi kui analüüsis kasutatav. Sõltumata sellest, kas mõnd spektri osa nõrgendatakse filtrimise abil või seadmete vältimatu filtrimistoimega, ei tohiks pärast nende filtrite läbimist registreeritud spekter erineda standardsest päevavalgusest vabas looduses (14). Viidetes 8 ja 16 on näidatud „kunstliku päikese" filtritud kiirgusvoo spektraalne jaotus; sellist valgust kasutati 3T3 NRU fototoksilisuse *in vitro* katse valideerimisel. Vt ka lisa 2 joonist 1.

1.4.1.5.2. Kiiritusannuse mõõtmine

Valguse intensiivsust (kiiritustihedust) tuleb regulaarselt kontrollida enne iga fototoksilisuse katset, kasutades sobivat lairiba-UV-mõõturit. Intensiivsust tuleb mõõta läbi sama tüüpi 96 süvendiga plaadi kaane, nagu kasutatakse analüüsis. UV-mõõtur peab olema kaliibritud konkreetse allika järgi. UV-mõõturi mõõtmiskvaliteeti tuleb kontrollida ja selleks on soovitatav kasutada teist, võrdlus-UV-mõõturit, mis on sama tüüpi ja identselt kaliibritud. Pikemate ajavahemike järel oleks väga hea kasutada spektroradiomeetrit valgusallika filtritud kiirguse spektri mõõtmiseks ja lairiba-UV-mõõturi kalibreeringu kontrollimiseks.

On näidatud (6 ja 17), et annus 5 J/cm^2 (mõõdetud UVA piires) ei ole tsütotoksiline Balb/c 3T3 rakkude suhtes, kuid on piisav, et ergastada kemikaale ja kutsuda esile fototoksilisi reaktsioone; annuse 5 J/cm^2 saavutamiseks 50 minutiga kasutati kiiritustihedust 1,7 mW/cm^2. Vt lisa 2 joonist 2. Kui kasutatakse muud rakuliini või valgusallikat, tuleb kiiritusannus kaliibrida nii, et saaks valida kiiritusrežiimi, mis ei ole rakkude jaoks kahjulik, kuid on piisav standardfototoksiinide ergastamiseks. Valgusega kokkupuute aeg arvutatakse järgmiselt:

▼B

$$t\ (\text{min}) = \frac{\text{kiiritusannus}\ (J/cm^2) \times 1000}{\text{kiiritustihedus}\ (mW/cm^2) \times 60} \quad (1\ \text{J} = 1\ \text{Wsec})$$

1.4.2. **Katsetingimused**

1.4.2.1. *Uuritava aine kontsentratsioon*

Annuse vahemiku määramise eelkatsetes määratakse uuritava aine kontsentratsiooni vahemik, mida kasutatakse kõnealuse aine toime uurimiseks valgustatud (+Irr) ja pimedas hoitud (–Irr) katsetes. Kuna lahustuvus võib aja jooksul või valgustamise ajal muutuda, võib olla kasulik hinnata lahustuvust katse alguses ja siis uuesti 60 minuti (või muu kasutatava töötlemisaja) pärast. Ebasobivate kasvutingimuste või liiga happeliste või aluseliste kemikaalide põhjustatud toksilisuse vältimiseks peab rakukultuuri pH pärast uuritava kemikaali lisamist jääma vahemikku 6,5–7,8.

Uuritava aine suurim kontsentratsioon peaks jääma füsioloogiliste katsetingimuste piiridesse, tuleks vältida rakkude osmootset või pH-stressi. Konkreetse uuritava kemikaali puhul võib osutuda vajalikuks võtta arvesse muid füüsikalisi ja keemilisi omadusi, mis võivat piirata uuritava aine kontsentratsiooni suurendamist katses. Raskesti lahustuvate ainete puhul, mis ei ole kuni lahustuvuse piirini toksilised, tuleks uurida kõige kõrgemat kontsentratsiooni, mida on võimalik saavutada. Üldiselt ei tohiks uuritav kemikaal sadeneda ühelgi uuritaval kontsentratsioonil. Uuritava aine maksimaalne kontsentratsioon ei tohiks ületada 1 000 μg/ml; osmolaarsus ei tohiks olla suurem kui 10 mmol/l. Tuleks kasutada kaheksat lahust uuritava aine kontsentratsioonidega, mis moodustavad konstantse lahjendusteguriga geomeetrilise jada (vt punkti 2.1 teist lõiku).

Kui annuse vahemiku kindlakstegemise katse näitas, et uuritav kemikaal ei ole kuni kõrgeima kontsentratsioonini tsütotoksiline pimedas (–Irr), kuid on väga tsütotoksiline kiiritatuna (+Irr), võivad (+Irr) katseteks valitavad kontsentratsioonid erineda nendest, mis valitakse (–Irr) katseteks, et saadavad andmed oleksid nõutava kvaliteediga.

1.4.2.2. *Kontrollkatsed*

1.4.2.2.1. Rakkude kiirgustundlikkus: varasema arengu andmete kindlakstegemine:

Rakkudel tuleb regulaarselt (umbes iga viienda passaaži järel) kontrollida tundlikkust valgusallika suhtes, hinnates nende elujõulisust pärast nende kokkupuudet suurenevate kiirgusdoosidega. Kõnealuse hindamise puhul tuleks kasutada mitut kiiritusannust, sealhulgas annuseid, mis on palju suuremad 3T3 NRU fototoksilisuse katses kasutatavatest. Nende dooside suurust on kõige kergem määrata valgusallika spektri UV-osade mõõtmistega. Rakud külvatakse tihedusel, mida kasutatakse *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses, ja neid kiiritatakse järgmisel päeval. Rakkude elujõulisus määratakse veel üks päev hiljem neutraalpunase sidumise järgi. Tuleb tõendada, et tulemuseks saadud suurim mittetsütotoksiline annus (näiteks valideerimisel: 5 J/cm^2 [UVA]) oli piisav võrdluskemikaalide (tabel 1) õigeks klassifitseerimiseks.

▼B

1.4.2.2.2. Kiirgustundlikkus: jooksva katse kontroll

Katse vastab kvaliteedikriteeriumidele, kui kiiritatud negatiivsetes või lahusti kontrollproovides on rakkudel alles üle 80 % elujõulisusest, võrrelduna mittekiiritatud negatiivsete või lahusti kontrollproovidega.

1.4.2.2.3. Lahusti kontrollproovide elujõulisus

Lahusti kontrollproovidest eraldatud neutraalpunase absoluutne optiline tihedus ($OD_{540\ NRU}$) näitab, kas igasse süvendisse külvatud 1×10^4 rakku on kasvanud normaalse kahekordistumisajaga analüüsi kahe päeva jooksul. Katse vastab nõuetekohasuse tingimustele, kui töötlemata kontrollide keskmine $OD_{540\ NRU}$ on > 0,4 (st umbes 20 korda suurem lahusti taustneeldumisest).

1.4.2.2.4. Positiivne kontrollproov

Teadaolevat fototoksilist kemikaali katsetatakse samaaegselt iga *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katsega. Selleks soovitatakse kloorpromasiini (CPZ). Standardeeskirja järgi *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses uuritud CPZ puhul määrati järgmised katse nõuetekohasuse tingimused: kiiritatud (+Irr) CPZ: IC_{50} = 0,1–2,0 µg/ml, mittekiiritatud (–Irr) CPZ: IC_{50} = 7,0–90,0 µg/ml. Fotoärrituvustegur (PIF) peaks olema > 6. Jälgida tuleks positiivse kontrolli varasemat tegemist.

Kloorpromasiini asemel võib samaaegsete positiivsete kontrollproovidena kasutada muid fototoksilisi kemikaale, mis kuuluvad uuritava kemikaaliga ühte kemikaalide klassi või on sarnase lahustuvusega.

1.4.3. **Katse käik (6–8, 16 ja 17):**

1.4.3.1. *Esimene päev*

96 süvendiga koekultuuri mikrotiiterplaadi välimistesse süvenditesse kantakse 100 µl kasvukeskkonda (pimekatse). Ülejäänud süvenditesse kantakse 100 µl rakususpensiooni kontsentratsiooniga 1×10^5 rakku kasvukeskkonna milliliitris (see tähendab 1×10^4 rakku süvendi kohta). Uuritava aine iga kontsentratsiooniseeria jaoks ning lahusti- ja positiivse kontrolli jaoks tuleks ette valmistada kaks plaati.

Rakke inkubeeritakse 24 tunni jooksul (vt punkti 1.4.1.2), kuni need moodustavad pooleldi laatunud monokihi. Kõnealune inkubeerimisperiood võimaldab rakkudel taastuda, kinnituda põhjale ja eksponentsiaalselt kasvada.

1.4.3.2. *Teine päev*

Pärast inkubeerimist dekanteeritakse kasvukeskkond rakkudelt ja rakke pestakse hoolikalt 150 µl inkubeerimiseks kasutatud puhverlahusega. Lisatakse 100 µl puhverlahust, mis sisaldab vajalikus kontsentratsioonis uuritavat kemikaali või lahustit (lahustiga kontrollproov). Kasutatakse uuritava kemikaali 8 kontsentratsiooni. Rakke inkubeeritakse uuritava ainega pimedas 60 minutit (vt punkti 1.4.1.2 ja punkti 1.4.1.4 teist lõiku).

Kahest plaadist, mis on ette valmistatud uuritava aine iga kontsentratsiooni ja kontrollproovide seeria jaoks, valitakse üks, tavaliselt juhuslikkuse alusel, tsütotoksilisuse (–Irr) määramiseks (see on kontrollplaat) ja teine fototsütotoksilisuse (+Irr) määramiseks (uuritav plaat).

▼B

Katse +Irr-osa läbiviimiseks kiiritatakse rakke toatemperatuuril 50 minutit läbi 96 süvendiga plaadi kaane suurima kiiritusdoosiga, millel ei ole veel tsütotoksilist mõju (vt ka lisa 2). Kiiritamata plaate (–Irr) hoitakse toatemperatuuril 50 minutit (s.o kogu kiiritamise aja) pimedas kastis.

Katselahus dekanteeritakse ja rakke pestakse hoolikalt kaks korda 150 µ1 inkubeerimiseks kasutatud, kuid uuritavat ainet mitte sisaldava puhverlahusega. Puhverlahus asendatakse kasvukeskkonnaga ja inkubeeritakse (vt punkti 1.4.1.2) hommikuni (18–22 tundi).

1.4.3.3. *Kolmas päev*

1.4.3.3.1. Uurimine mikroskoobiga

Rakke vaadeldakse kasvu, morfoloogia ja monokihi terviklikkuse hindamiseks faasikontrastmikroskoobiga. Märgitakse üles kõik muutused rakkude morfoloogias ja mõjud rakkude kasvule.

1.4.3.3.2. Neutraalpunase sidumise katse

Rakke pestakse 150 µl eelsoojendatud puhvriga. Pesemislahus eemaldatakse ettevaatliku koputamisega. Lisatakse 100 µl neutraalpunase (3-amino-7-dimetüülamino-2-metüülfenasiinhüdrokloriid, EINECSi number 209-035-8; CASi number 553-24-2; C.I. 50040) lahust kontsentratsiooniga 50 µg/ml seerumit mittesisaldavas keskkonnas (16) ja inkubeeritakse 3 tundi, nagu on kirjeldatud punktis 1.4.1.2. Pärast inkubeerimist eemaldatakse neutraalpunase keskkond ja rakke pestakse 150 µl puhverlahusega. Liigne puhver dekanteeritakse ja eemaldatakse kuivatamise või tsentrifuugimisega.

Lisatakse täpselt 150 µl neutraalpunase desorbeerimislahust (mis on värskelt valmistatud 49 osast veest, 50 osast etanoolist ja 1 osast äädikhappest).

Mikrotiiterplaati loksutatakse ettevaatlikult mikrotiiterplaadi loksutil 10 minutit, kuni neutraalpunane on väljunud rakkudest ja moodustanud homogeense lahuse.

Spektrofotomeetriga mõõdetakse neutraalpunase ekstrakti optiline tihedus 540 nm jumes, kasutades võrdlusena pimekatse süvendeid. Andmed salvestatakse sobivas elektroonilise faili formaadis edaspidiseks analüüsiks.

2. **ANDMED**

2.1. ANDMETE KVALITEET JA HULK

Katseandmete alusel peaks saama analüüsida kiiritatud ja kiiritamata proovides avaldunud mõju sõltuvust kontsentratsioonist ja võimaluse korral määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon, millel rakkude elujõulisus väheneb 50 % (IC_{50}). Tsütotoksilisuse esinemisel valitakse nii kontsentratsioonide vahemik kui ka üksikud kontsentratsioonid selliselt, et sõltuvust saaks sobitada katseandmetega.

Nii selgelt positiivsete kui ka selgelt negatiivsete tulemuste (vt punkti 2.3 esimest lõiku) puhul võib piisata esmasest katsest, millele on toeks üks või mitu annuste vahemiku määramiseks tehtud eelkatset.

▼B

Raskesti tõlgendatavat, piiripealset või ebaselget tulemust tuleks selgitada edasiste katsete abil (vt ka punkt 2.4 teine lõik). Sel juhul tuleks kaaluda katsetingimuste muutmist. Katsetingimustes võib muuta kontsentratsioone või nende intervalle, inkubeerimiseelset aega ja kiiritamisaega. Vees ebapüsivate kemikaalide puhul võib sobida lühem kokkupuuteaeg.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE

Andmete hindamise võimaldamiseks võib arvutada fotoärrituvustegur (*Photo-Irritation-Factor,* PIF) või keskmise fotoefekti (*Mean Photo Effect,* MPE).

Fototsütotoksilisuse näitajate arvutamiseks (vt allpool) on vaja lähendamisega panna läbi kontsentratsiooni ja mõju määratud väärtuste mingi sobiv pidev kontsentratsiooni-mõju kõver (mudel). Kõvera sobitamine andmetega toimub tavaliselt mittelineaarse regressiooni meetodil (18). Selleks et hinnata, kuidas andmete varieerumus mõjutab sobitatud kõvera parameetreid, soovitatakse kasutada *bootstrap*-meetodit.

Fotoärrituvustegur (PIF) arvutatakse järgmise valemi abil:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Kui kiiritatud või kiiritamata proovides ei saa IC_{50} arvutada, siis ei saa katsematerjali PIFi määrata.Keskmine fotoefekt (MPE) põhineb täielike kontsentratsiooni-mõju sõltuvuste võrdlemisel (19). See on fotoefekti väärtuste esindusliku hulga kaalutud keskmine:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Fotoefekt PE_C igal kontsentratsioonil C on võrdne mõjuefekti RE_C ja annuseefekti DE_C korrutisega s.t $PE_c = RE_c \times DE_C$. Mõjuefekt RE_C on kiiritatud ja kiiritamata proovides avaldunud mõju vahe, s.t $RE_c = R_c$ (—Irr) – R_c (+Irr). Annuseefekt leitakse järgmiselt:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

kus C* on ekvivalentsuskontsentratsioon, s.o kontsentratsioon, mille puhul +Irr-mõju võrdub –Irr-mõjuga kontsentratsioonil C. Kui C* ei ole võimalik määrata, kuna mõju väärtused +Irr-kõveral on süstemaatiliselt kõrgemad või madalamad kui R_c (–Irr), loetakse annuseefekt võrdseks ühega. Kaalutegurid W_i on määratud kõrgeima mõju väärtusega, st W_i = MAX {R_i (+Irr), R_i (–Irr) }. Kontsentratsioonide võrk C_i valitakse nii, et ühepalju punkte langeks igasse kontsentratsiooniintervalli, mis on määratud katses kasutatud kontsentratsiooni väärtustega. MPE arvutamine on piiratud maksimaalse kontsentratsiooni väärtusega, mille puhul vähemalt ühel kahest kõverast on veel näha vähemalt 10 %list mõju. Kui see maksimaalne kontsentratsioon on kõrgem kui +Irr-katses kasutatud kõrgeim kontsentratsioon, loetakse +Irr-kõvera ülejäänud osas mõju väärtus võrdseks nulliga. Sõltuvalt sellest, kas MPE väärtus on suurem kui nõuetekohaselt valitud piirväärtus (MPE_c = 0,15) või mitte, liigitatakse kemikaal fototoksiliseks.

▼B

Tarkvarapaketi PIF ja MPE arvutamiseks võib leida viite 20 veebilehel.

2.3. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Valideerimisuuringu (8) põhjal võib öelda, et uuritava aine PIF < 2 või MPE < 0,1 puhul võib ennustada, et aine ei ole fototoksiline. Kui PIF > 2 ja < 5 või MPE > 0,1 ja < 0,15, siis on võimalik, et aine on fototoksiline; kui PIF > 5 või MPE > 0,15, siis võib ennustada, et aine on fototoksiline.

Igas laboris, kus seda analüüsi esmakordselt läbi viiakse, tuleks enne uuritavate ainete fototoksilisuse hindamisele asumist mõõta tabelis 1 osutatud etalonaineid. Leitavad PM või MPE väärtused peaksid olema lähedased tabelis 1 esitatud väärtustele.

Tabel 1

Keemiline nimetus	EINECSi nr	CASi nr	PIF	MPE	Neeldumismaksimum	Lahusti ([1])
amiodaroon HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (õlg)	etanool
kloorpromasiin HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanool
norfloksatsiin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	atsetonitriil
antratseen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	atsetonitriil
Dinaatriumprotoporfüriin IX	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	etanool
L-histidiin		[7006-35-1]	PIFi ei esine	0,05–0,10	211 nm	vesi
heksaklorofeen	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317 nm (õlg)	etanool
naatriumlaurüülsulfaat	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00–0,05	neeldumist ei esine	vesi

([1]) Neeldumise mõõtmiseks kasutatav lahusti.

2.4. ANDMETE TÕLGENDAMINE

Kui fototoksiline mõju avaldub ainult kõige kõrgemal uuritud kontsentratsioonil (eriti vees lahustuvate uuritavate ainete puhul), tuleb ohu hindamisel lisaks arvestada veel muid asjaolusid. Nende hulka võivad kuuluda neeldumine nahas ja kemikaali kogunemine nahas ning muude katsete andmed, näiteks uuringud, kuidas kemikaal mõjub looma või inimese nahale *in vitro* või naha mudelitele.

▼B

Kui toksilisust ei ilmne (+Irr ja –Irr) ja kui halb lahustuvus ei luba uurida kõrgemaid kontsentratsioone, võib küsida, kas käesolev meetod sobib aine uurimiseks; sel juhul tuleb kaaluda kinnitavate uuringute läbiviimist, näiteks teise mudeliga.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama vähemalt järgmist teavet.

Uuritav aine:

— andmed aine määratlemiseks, tavanimetused ning IUPACi ja CASi numbrid, kui need on teada;

— füüsikaline olek ja puhtus;

— uuringu tegemisel olulised füüsikalis-keemilised omadused;

— UV/nähtava valguse neeldumisspekter;

— stabiilsus ja fotostabiilsus, kui need on teada.

Lahusti:

— lahusti valiku põhjendus;

— uuritava kemikaali lahustuvus lahustis;

— lahusti protsendiline sisaldus töötlemiskeskkonnas.

Rakud:

— rakkude tüüp ja päritolu;

— mükoplasma puudumine;

— raku passaaži number, kui see on teada;

— rakkude kiirgustundlikkus, mis on määratud kiiritusseadmete abil, mida kasutatakse *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses.

Katse tingimused (1): *inkubeerimine enne ja pärast töötlust:*

— kasvukeskkonna tüüp ja koostis;

— inkubeerimistingimused (CO_2 kontsentratsioon, temperatuur, niiskus);

— inkubeerimise kestus (enne töötlust, pärast töötlust).

Katse tingimused (2): *töötlemine kemikaaliga:*

— kiiritatud ja kiiritamata proovides kasutatud uuritava kemikaali kontsentratsioonide valiku põhjendus;

— uuritava kemikaali piiratud lahustuvuse ja tsütotoksilisuse puudumise puhul: kõrgeima uuritud kontsentratsiooni valiku põhjendus;

— töötlemiskeskkonna tüüp ja koostis (soolasisaldusega puhverlahus);

— kemikaaliga töötlemise kestus.

Katse tingimused (3): *kiiritamine:*

— kasutatud valgusallika – valiku põhjendus;

▼B

— valgusallika ja kiirgusmõõtja valmistaja ja tüüp;

— valgusallika kiirguse spektri näitajad;

— kasutatud filtri(te) läbilaskvuse ja neeldumise näitajad;

— kiirgusmõõtja iseloomustus ja kaliibrimise üksikasjad;

— valgusallika kaugus katsesüsteemist;

— UVA-kiirgus kõnealuse kauguse puhul, väljendatuna mW/cm^2;

— UV/nähtava valgusega kiiritamise kestus;

— UVA-annus (kiiritustihedus × aeg), väljendatuna J/cm^2;

— rakukultuuride temperatuur kiiritamise ajal ja samaaegselt pimedas hoitud rakukultuuride temperatuur.

Katse tingimused (4): *elujõulisuse määramine neutraalpunase abil:*

— neutraalpunasega töötlemise keskkonna koostis;

— neutraalpunasega inkubeerimise kestus;

— inkubeerimistingimused (CO_2 kontsentratsioon, temperatuur, niiskus);

— neutraalpunase ekstraheerimise tingimused (ekstrahent; kestus);

— neutraalpunase optilise tiheduse spektrofotomeetriliseks määramiseks kasutatud lainepikkus;

— teine (võrdlus)lainepikkus, kui seda kasutati;

— mida kasutati spektrofotomeetrilise pimekatsena (kui kasutati).

Tulemused:

— rakkude mõõdetud elujõulisus uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil, võrreldes samaaegsete lahustikontrollproovide keskmise elujõulisusega, protsentides;

— kontsentratsiooni-mõju sõltuvused (rakkude suhtelise elujõulisuse sõltuvus uuritava kemikaali kontsentratsioonist), mis on saadud samaaegsete +Irr- ja –Irr-katsetega;

— kontsentratsiooni-mõju sõltuvuste analüüs: võimaluse korral IC_{50} (+Irr) ja IC_{50} (–Irr) arvutamine;

— kiiritatud ja kiiritamata proovidest mõõdetud kahe kontsentratsiooni-mõju sõltuvuse võrdlus kas fotoärrituvusteguri (PIF) või keskmise fotoefekti (MPE) arvutamisega;

— katse nõuetekohasuse tingimused; samaaegsed lahustikontrollproovid:

— kiiritatud ja kiiritamata rakkude absoluutne elujõulisus (neutraalpunase ekstrakti optiline tihedus);

— varasemad negatiivsete ja lahustikontrollproovide andmed; keskväärtused ja standardhälbed;

— katse nõuetekohasuse tingimused; samaaegne positiivne kontrollproov;

▼B

— positiivse kontrollina kasutatud kemikaali IC_{50} (+Irr) ja IC_{50} (–Irr) ning PIF/MPE;

— varasemad andmed positiivse kontrolli kemikaali kohta: IC_{50} (+Irr) ja IC_{50} (–Irr) ja PIF/MPE; keskväärtused ja standardhälbed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95–102.

2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI–XXXV.

3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A, Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314–348.

4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79–110.

5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris.

6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLJPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8. 793–796.

7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7–8.

8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EÜ/COLIPA IN *vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305–327.

9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119–124.

11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, a. 225-237.

▼B

12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515–530.

13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825–1829.

14) ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16) ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679–708.

18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127–138.

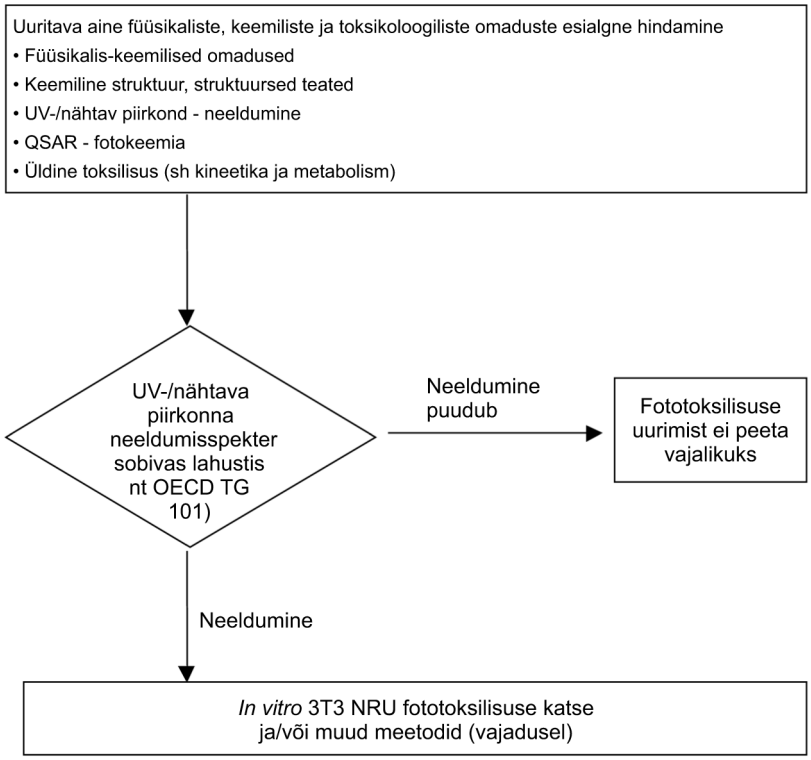
19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

20) http://ww.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

1. Lisa

3T3 NRU PT osa kemikaalide fototoksilisuse uuringu jadakäsitlusel

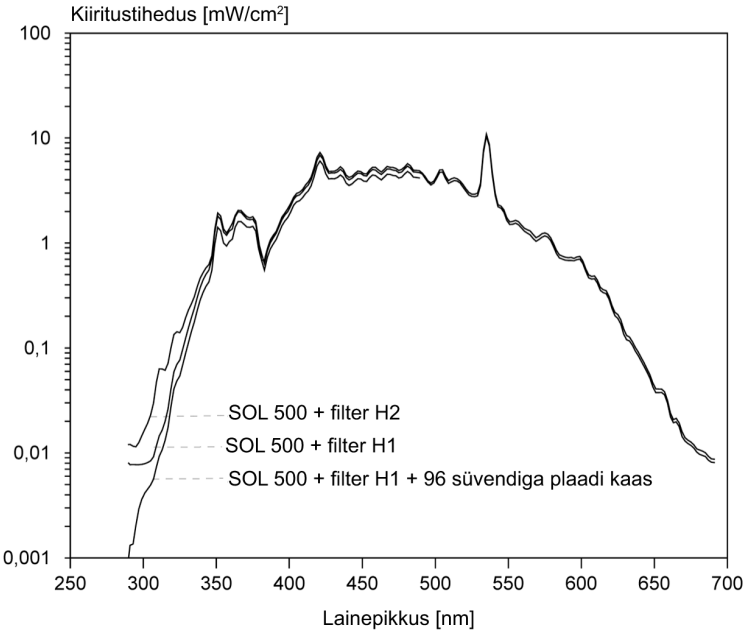


▼B

2. Lisa

Joonis 1

„Kunstliku päikese” filtritud kiirgusvoo spektraaljaotus



(vt punkti 1.4.1.5 teist lõiku)

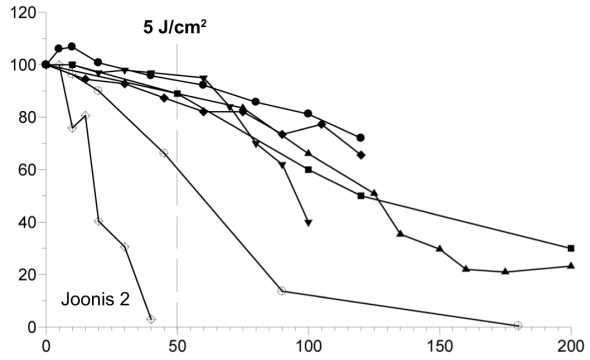
Joonisel 1 on esitatud näide, milline peaks olema „kunstliku päikese” flltritud kiirgusvoo spektraaljaotus. Valgusallikas on dopeeritud metallhalogeniidkaarlamp, mida kasutati 3T3 NRU fototoksilisuse määramise valideerimisel (6, 8, 17). Joonisel on näidatud kahe erineva filtri toime ja 96 süvendiga rakukultuuri plaadi kaane täiendav filtriv toime. Filtrit H2 kasutati ainult katsesüsteemide puhul, mis taluvad suuremat hulka UVB kiirgust (nahamudeli test ja vere punaliblede foto-hemolüüsi test). 3T3 NRU fototoksilisuse katses kasutati filtrit H1. Jooniselt on näha, et plaadi kaane täiendav filtriv toime ilmneb peamiselt UVB kiirguse alas; siiski jääb kiirgusspektrisse piisavalt UVB kiirgust, et ergastada selliseid kemikaale nagu amiodaroon, mille neeldumisspekter asub tavaliselt UVB kiirguse piirkonnas (vt tabelit 1).

▼B

Joonis 2

Balb/c 3T3 rakkude kiirgustundlikkus (mõõdetud UVA kiirguse alas)

Rakkude elujõulisus (neutraalpunase sidumise protsent kiiritamata kontrollproovides)



kiiritamise aeg (minutites)

(10 min = 1 džaul UVA/cm²)

(vt punkti 1.4.1.5.2 teist lõiku ja punkte 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Balb/c 3T3 rakkude tundlikkus 3T3 NRU fototoksilisuse katse valideerimisel kasutatud „kunstliku päikesega" kiiritamise suhtes, mõõdetuna UVA piirkonnas. Joonisel on näidatud seitsmes laboris saadud valideerimiseelsed tulemused (1). Kaks valgete sümbolitega sõltuvust saadi vananenud rakkudega (palju passaaže), need rakud tuli asendada uute varurakkudega; mustade sümbolitega sõltuvused iseloomustavad rakke, kelle kiirgustaluvus on lubatud piirides.

Nendest andmetest määrati kõrgeim mittetsütotoksiline kiirgusdoos 5 J/cm^2. Vertikaalne katkendjoon näitab lisaks maksimaalset kiirgustaluvust, mida käsitletakse punktis 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÕLMEDE KATSE**

SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja nendel põhinevaid ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Varem on vastu võetud originaalkatsemeetod hiire naha sensibiliseerimise määramiseks lokaalsete lümfisõlmede katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429; käesoleva lisa peatükk B.42) (1). Kirjanduses on avaldatud LLNA valideerimise üksikasjad ja ülevaade sellega seotud töödest (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Ajakohastatud LLNA põhineb katse- ja teaduslike andmete hindamisel (12). See on teine katsemeetod, mis on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Teise meetodi puhul (OECD katsejuhend 406, käesoleva lisa peatükk B.6) kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (13). LLNA-l on B.6 ja OECD katsejuhendiga 406 (13) võrreldes loomade heaoluga seotud eeliseid. Käesolev LLNA juhend hõlmab tulemuslikkusnõudeid (1. liide), mida võib kasutada selliste uute ja/või modifitseeritud katsemeetodite valideerimisolukorra hindamiseks, mis on tööpõhimõttelt ja teostuslikult sarnased LLNAga, vastavalt OECD katsejuhendi nr 34 (14) põhimõtetele.

2. LLNAga uuritakse naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Tuleb märkida, et pehmed/mõõdukad sensibiliseerijad, mida soovitatakse sobivate positiivse kontrolli kemikaalidena merisigade katsemeetodite jaoks (need on B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13), sobivad kasutamiseks ka LLNA puhul (6, 8, 15). Vähendatud LLNAd, mille puhul kasutatakse kuni 40 % vähem loomi, on kirjeldatud ühe võimalusena ka käesolevas katsemeetodis (16, 17, 18). Vähendatud LLNAd võib kasutada, kui on regulatiivne vajadus kinnitada naha sensibiliseerimise võime negatiivset ennustust; seejuures tuleb järgida kõiki muid LLNA katse-eeskirja üksikasju, nagu on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis. Negatiivse tulemuse ennustus peab põhinema kogu kättesaadaval teabel, nagu on kirjeldatud punktis 4. Enne vähendatud LLNA lähenemisviisi kohaldamist tuleb esitada selged põhjendused ja selle meetodi kasutamise teaduslik alus. Kui vähendatud LLNAga saadakse positiivne või kaheti tõlgendatav tulemus, võib vaja minna lisakatseid tulemuste tõlgendamiseks või selgitamiseks. Vähendatud LLNAd ei tohiks kasutada ainete nahka sensibiliseeriva toime ohu uurimiseks sellisel juhul, kui on vaja teavet annuse-immuunvastuse seose kohta, näiteks alakategooriatesse klassifitseerimiseks vastavalt määrusele (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist, ning ÜRO ühtsele ülemaailmsele kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemile.

MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 2. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA on alternatiivne meetod võimalike nahka sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) asemel LLNAd, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist. Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave hõlmab aine

▼M3

nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi ja struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

5. LLNA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Siiski võimaldab see vähendada selleks vajalike loomade arvu. Lisaks võimaldab LLNA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks (vähem tekitatakse valu ja kannatusi). LLNA põhineb sellel, et uuritakse kemikaalide immunoloogilist mõju sensibiliseerimise induktsioonifaasi ajal. Erinevalt merisigadega tehtavatest katsetest (s.o B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) ei eelda LLNA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioonid. Samuti ei eelda LLNA adjuvandi kasutamist, nagu seda tehakse merisigadega tehtava maksimeerimiskatse puhul (13). Seega vähendab LLNA loomadele valu ja kannatuste tekitamist. Hoolimata LLNA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 kohaste katsetega võrreldes tuleks tunnistada, et on teatud piirangud, mis võivad tingida B.6 või OECD katsejuhendi 406 (13) kohaste katsete kasutamise (nt LLNA valenegatiivid teatavate metallide puhul, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teatavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (19, 20) või probleemid uuritavate ainete lahustuvusega). Lisaks võib teatavate kemikaaliklasside või selliste ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivaid funktsionaalseid rühmi (21), olla vaja kasutada meriseakatseid (B.6 või OECD katsejuhend 406) (13). Kuna valideerimise andmebaas oli piiratud (eelkõige uuriti pestitsiidivorme), võib LLNA tõenäolisemalt kui meriseakatsed anda positiivse tulemuse sellist tüüpi uuritava aine puhul (22). Vormide uurimisel tuleks kaaluda seda, et võrdlusainena lisatakse samalaadseid aineid, mille tulemused on teada, et tõendada LLNAga saadavate tulemuste õigsust (vt punkt 16). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA olema kohaldatav igasuguste ainete uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNAga saadavate tulemuste õigsust.

KATSE PÕHIMÕTE

6. LLNA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis dreenivad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kontrollrühmas leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 3 selleks, et uuritava aine võiks klassifitseerida võimalikuks naha sensibiliseerijaks. Siin kirjeldatud meetodid põhinevad radioaktiivse märgise kasutamisel *in vivo*; selle meetodiga mõõdetakse vohavate rakkude arvu suurenemist kõrvalesta dreenivates lümfisõlmedes. Kuid vohavate rakkude arvu hindamiseks võib kasutada ka muid väljundeid tingimusel, et need täielikult vastavad tulemuslikkusnõuetele (1. liide).

▼M3

KATSE KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. Kasutatakse CBA/Ca või CBA/J liini noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

Pidamis- ja söötmistingimused

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (23), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Loomade ettevalmistamine

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

Annustamislahuste valmistamine

10. Tahke uuritav aine tuleb lahustada või suspendeerida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiiniseadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

Usaldusväärsuse kontroll

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Ka mõned reguleerivad asutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katseid, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA immuunvastuse kokkupuutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) üle kolme korra, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks

▼**M3**

korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeks üle 20 on liiga suur). Eelistatavad positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (Chemical Abstracts Service'i (CASi) nr 101-86-0) atsetooni-oliiviõli segus (4: 1, v/v) ja 5 % merkaptobensotiasool (CASi nr 149-30-4) *N*,*N*-dimetüülformamiidis (vt 1. liide, tabel 1). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st vähemalt kord kuus) tehakse LLNAd ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahemiku (vähem kui aasta) jooksul.

13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija) ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.

14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katses saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatseni uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (12).

15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4: 1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (24). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.

16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esile kutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:

— struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;

— teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;

— varasemad toetavad LLNA andmed;

— toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

▼M3

KATSE KÄIK

Loomade arv ja annusemäärad

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–14). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse nii nagu katserühma loomi, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.

18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes 3 ja 5 antud soovitustel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus. Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalis-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et kõrgeim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (3, 25). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).

19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada kõrgeimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitatavad kandeained on atsetoon-oliiviõli (4: 1, v/v), *N*,*N*-dimetüülformamiid, metüületüülketoon, propüleenglükool ja dimetüülsulfoksiid (19), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutuda vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdrofiilsed uuritavad ained kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ega voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.

20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainetega tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 35). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (12). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Mõned reguleerivad asutused peavad vastuvõetavaks katseloomade koondandmeid ja siis võivad meetodi kasutajad valida, kas koguda iga üksiku looma andmeid või koondandmeid

Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % vedela uuritava aine puhul või kõrgeim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.

▼M3

22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA põhikatse, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse kehakaal enne katset ja enne katse lõppu (6. päev). Iga hiire kumbagi kõrvalesta uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (25). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust) ja 6. päeval. Lisaks võib 6. päeval mõõta kõrvalesta paksuse, milleks pärast looma humaanset surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (26, 27). LLNA põhikatse jaoks valitud kõrgeim annus on järgmine madalam annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), millel ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemäärast nahaärritust.

Tabel 1

Punetuse hinne

Nähud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta paksuse 25 % suurenemisele (26, 27) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (28, 29, 30, 31, 32, 33, 34). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (30, 32, 33, 34).

24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (35, 36) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordinatsiooni kadu, värin ja krambid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuahmimine, räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1. kuni 6. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaanselt surmata (37).

▼M3

Põhiuuringu katse ajakava

25. Katse ajakava on järgmine.

— *1. päev:* määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kummagi kõrvalesta välisküljele kantakse 25 µl sobivalt lahjendatud uuritavat ainet, üksnes kandeainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).

— *2. ja 3. päev:* korratakse 1. päeval tehtud pealekandmist.

— *4. ja 5. päev:* loomi ei töödelda.

— *6. päev:* registreeritakse iga looma mass. Igale katse- ja kontrollrühma hiirele süstitakse sabaveeni kaudu 250 µl fosfaatpuhvriga soolalahust, mis sisaldab 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) triitiumiga märgistatud ^{3}H-metüültümidiini. Asendusvõimalusena süstitakse kõikidele hiirtele sabaveeni kaudu 250 µl fosfaatpuhvriga soolalahust, mis sisaldab 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jododesoksüuridiini ja 10^{-5} M fluorodesoksüuridiini. Viis tundi hiljem loomad surmatakse humaanselt. Igal katseloomal lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta dreenivad lümfisõlmed ja töödeldakse neid koos fosfaatpuhvriga soolalahuses (üksiku katselooma lähenemisviis); asendusvõimalusena lõigatakse välja iga katseloomade rühma loomade kumbagi kõrvalesta dreenivad lümfisõlmed ja pannakse need kõik koos fosfaatpuhvriga soolalahusesse (iga katserühma ühendatud proovide lähenemisviis). Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites (12). Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksusemõõtjaga või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga välja löödud tüki massi mõõtmisega).

Rakususpensioonide valmistamine

26. Valmistatakse iga üksiku looma mõlemalt poolelt (üksiku katselooma lähenemisviis) või katserühma loomadelt (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis) välja lõigatud ühendatud lümfisõlmede üksikrakususpensioon, milleks rakud eraldatakse üksteisest ettevaatliku mehaanilise töötlemisega, filtrides läbi 200 µm avaga roostevabast terasest võrgu, või kasutatakse muud sobivat võtet üksikrakususpensiooni valmistamiseks. Lümfisõlmerakke pestakse kaks korda suure koguse fosfaatpuhvriga soolalahusega ja sadestatakse DNA 5 % trikloroäädikhappega 4 °C juures 18 tunni jooksul (3). Põhja tsentrifuugitud sade kas suspendeeritakse uuesti 1 ml trikloroäädikhappes ja kantakse 10 ml stsintillatsioonivedelikku sisaldavasse stsintillatsioonipudelisse ^{3}H-loendamiseks või pannakse otse gammaloenduri torru ^{125}I-loendamiseks.

Rakkude vohamise määramine imendunud radioaktiivsuse järgi

27. ^{3}H-metüültümidiini imendumist mõõdetakse β-stsintillatsiooni loendamise teel lagunemiste arvuna minutis (*disintegrations per minute*, DPM). ^{125}I-jododesoksüuridiini imendumist mõõdetakse ^{125}I-loendamise teel ning väljendatakse samuti lagunemiste arvuna minutis. Sõltuvalt kasutatavast lähenemisviisist väljendatakse radioaktiivse märgise imendumist DPM-ides katselooma kohta (üksiku katselooma lähenemisviis) või DPM-ides katserühma kohta (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis).

Vähendatud LLNA

28. Teatud juhtudel, kui on regulatiivne vajadus kinnitada, et aine ei sensibiliseeri nahka, võib valikuliselt kasutada vähendatud LLNA eeskirja (16, 17, 18), milleks kulub vähem katseloomi; seejuures tuleb järgida kõiki käesolevas katsemeetodis kirjeldatud muid LLNA katse-eeskirja üksikasju. Enne vähendatud LLNA lähenemisviisi kohaldamist tuleb esitada selged põhjendused ja selle meetodi kasutamise teaduslik alus. Kui saadakse positiivne või kaheti tõlgendatav tulemus, võib vaja minna lisakatseid tulemuste tõlgendamiseks või selgitamiseks.

▼M3

29. Ainus erinevus LLNA ja vähendatud LLNA katse-eeskirjade vahel on vähendatud annuserühmade arv ja seepärast ei saada vähendatud LLNAga teavet immuunvastuse annusest sõltuvuse kohta. Seepärast ei saa vähendatud LLNAd kasutada, kui on vaja teavet immuunvastuse annusest sõltuvuse kohta. Nagu paljuannuselise LLNA puhul, nii ka vähendatud LLNA puhul peaks uuritava aine kontsentratsioon olema kõrgeim kontsentratsioon, millel ei avaldu selge süsteemne toksilisus hiire jaoks ega ülemäärane paikne nahaärritus (vt punkt 18).

TÄHELEPANEKUD

Kliinilised tähelepanekud

30. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmatakse valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitus (37).

Kehamass

31. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

TULEMUSTE ARVUTAMINE

32. Iga katserühma tulemused väljendatakse stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. Üksiku katselooma lähenemisviisi puhul tuletatakse SI, jagades iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmise DPMi hiire kohta lahusti-/kandeaine-kontrollrühma keskmise DPM-iga hiire kohta. Keskmine SI kandeaine-kontrollrühmade puhul on seega 1. Katserühma ühendatud proovide lähenemisviisi korral saadakse SI, jagades iga katserühma ühendatud radioaktiivsuse imendumise ühendatud kandeaine-kontrollrühma imendumisega; selle tulemuseks on keskmine SI.

33. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 3. Kuid piiripealse tulemuse positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõlalisust (4, 5, 6).

34. Kui saadud tulemust on vaja selgitada, tuleks arvesse võtta uuritava aine omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibilisaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on arutatud üksikasjalikult viites 7.

35. Radioaktiivsusandmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paariviisiline annuserühmade ja paralleelsete kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paariviisiliste võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikku dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalejätmisega (nn võõrväärtused).

▼M3

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

36. Andmed tuleb koondada tabelisse. Üksiku katselooma lähenemisviisi puhul esitatakse üksiklooma DPMi väärtus, rühma keskmine suhte DPM/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse kandeaine-kontrollrühma SI-ga. Katserühma ühendatud proovide lähenemisviisi korral esitage keskmine DPM / mediaan-DPM ja keskmine SI iga annuserühma jaoks, võrreldуna paralleelse kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

Katseprotokoll

37. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

uuritav aine ja kontrollaine:

— tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);

— füüsikaline laad ja füüsikalis-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);

— kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad;

lahusti/kandeaine:

— tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);

— kandeaine valiku põhjendus;

katseloomad:

— CBA-liini hiirte allikas;

— loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;

— loomade arv ja vanus;

— loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

katsetingimused:

— uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;

— annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);

— kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;

— toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);

— annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;

— toksilisuse mõõtmise meetodid;

— kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;

— kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi;

usaldusväärsuse kontroll:

— kokkuvõte viimase usaldusväärsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;

— katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja negatiivse kontrolli andmed;

▼M3

— kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriprotokoll ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist;

tulemused:

— iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud surmamist; samuti iga katserühma keskväärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);

— iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;

— iga katserühma DPMi väärtused ja SI väärtused tabelina iga üksiku hiire kohta (üksiku katselooma lähenemisviis) või keskväärtus/mediaan (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis);

— iga katserühma DPMi/hiire keskväärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused üksiku katselooma lähenemisviisi puhul;

— arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas üksiku katselooma lähenemisviisi puhul;

— annuse-immuunvastuse sõltuvus;

— vajaduse korral statistilised analüüsid;

tulemuste arutelu:

— lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

KIRJANDUS

1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Vt http://www.oecd.org/env/testguidelines

2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165–169.

3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13–31.

4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.

5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985–997.

7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327–33.

▼M3

8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49–59.

9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258–273.

10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274–286.

11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249–257.

12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf

13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Vt http://www.oecd.org/env/testguidelines

14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt http://www.oecd.org/env/testguidelines

15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281–284.

16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.

17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Vt http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf

18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt http://iccvam.niehs.nih.gov/

19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf

▼M3

20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt http://iccvam.niehs.nih.gov/

23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71–89.

25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Vt http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf

28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195–206.

29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83–94.

30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245–256.

31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Vt http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm

37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Vt http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

1. liide

Naha sensibiliseerimise määramiseks pakutava samalaadse või muudetud LLNA katsemeetodi tulemuslikkusnõuded

SISSEJUHATUS

1. Tulemuslikkusnõuete eesmärk on esitada alus, mille põhjal uusi katsemeetodeid, nii kaitstud (autoriõiguse või kaubamärgiga või registreeritud) meetodeid kui ka kaitsmata meetodeid, saaks tunnistada konkreetse uuringu jaoks piisava täpsuse ja usaldusväärsusega meetodiks. Selliseid valideeritud ja tunnustatud meetoditel põhinevaid tulemuslikkusnõudeid saab kasutada selleks, et hinnata muude samalaadsete, samadele teaduslikele põhimõtetele tuginevate ja samade bioloogiliste või toksiliste mõjude mõõtmiseks või ennustamiseks kasutatavate, nn mina-kah-meetodite usaldusväärsust ja täpsust (14).

2. Enne muudetud meetodi, s.o kinnitatud meetodi võimaliku täiustatud variandi vastuvõtmist peaks toimuma hindamine, et teha kindlaks kavandatud muudatuste mõju katse tulemuslikkusele ja millisel määral sellised muudatused mõjutavad teavet muude valideerimisprotsessi osade kohta. Olenevalt pakutavate muudatuste arvust ja laadist, muudatuste kohta saadud andmetest ja muudatusi toetavatest dokumentidest tuleks nende suhtes kohaldada kas sama valideerimisprotsessi kui uue katsemeetodi puhul või usaldusväärsuse ja asjakohasuse piiratud hindamist kehtestatud tulemuslikkusnõuete alusel (14).

3. Käesoleva katsemeetodi alusel kavandatud ja kasutamiseks esitatud menetlusi tuleks hinnata, et määrata kindlaks nende usaldusväärsus ja täpsus kõikide ainete puhul, mis esindavad kogu LLNA hinneteskaalat. Katseloomade põhjendamatu kasutamise vältimiseks soovitatakse tungivalt, et mudelite väljatöötajad peaksid nõu asjaomaste asutustega, enne kui alustavad käesolevas katsemeetodis esitatud tulemuslikkusnõuete ja suuniste kohaseid valideerimisuuringuid.

4. Tulemuslikkusnõuded põhinevad USA alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (US-ICCVAM), alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskuse (EC-ECVAM) ja alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskuse (JaCVAM) ühtlustatud tulemuslikkusnõuetel (12), mille alusel hinnatakse LLNA samalaadsete või muudetud versioonide valideeritust. Tulemuslikkusnõuded koosnevad katsemeetodite olulisematest osadest, soovitatavatest võrdluskemikaalidest ning täpsus- ja usaldatavusnõuetest, millele pakutav meetod peaks vastama või mida ta peaks ületama.

I. **Katsemeetodi olulised osad**

5. Samalaadse või muudetud LLNA-meetodi tööpõhimõttelise ja teostusliku analoogia tagamiseks LLNAga ning sama bioloogilise mõju mõõtmiseks peaksid katse-eeskirjas olema järgmised osad:

— uuritavat ainet tuleks paikselt kanda hiire mõlemale kõrvalestale;

— tuleks mõõta lümfotsüütide vohamist lümfisõlmedes, mis dreenivad uuritava aine pealekandmise kohta;

— lümfotsüütide vohamist tuleks mõõta naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ajal;

▼M3

— uuritavate ainete puhul peaks valitav annus olema kõrgeim kontsentratsioon, millel ei avaldu hiire jaoks süsteemne toksilisus ega ülemäärane paikne nahaärritus. Positiivsete võrdluskemikaalide puhul peaks suurim annus olema vähemalt sama suur kui asjaomase võrdluskemikaali EC3 väärtus LLNA puhul (vt tabel 1), mille puhul ei avaldu hiire jaoks süsteemne toksilisus ega ülemäärane paikne nahaärritus;

— igas uuringus peaks olema paralleelne kandeaine-kontrollrühm ja vajaduse korral ka positiivse kontrolli rühm;

— igas annuserühmas tuleks kasutada vähemalt nelja katselooma;

— võib koguda andmeid kas üksiku katselooma kohta või katseloomade ühendatud andmeid.

Kui mõni neist kriteeriumidest ei ole täidetud, ei saa siin esitatud tulemuslikkusnõudeid kasutada samalaadse või muudetud meetodi valideerimiseks.

II. **Võrdluskemikaalide miinimumloetelu**

6. US-ICCVAMi, EC-ECVAMi ja JaCVAMi ühtlustatud tulemuslikkusnõuetes (12) on esitatud 18 võrdluskemikaali kui miinimumhulk, mida tuleks kasutada, ja neli valikulist võrdluskemikaali (need on ained, mis andsid LLNAga kas valepositiivne või -negatiive, kui võrrelda neid inimesel ja meriseal saadud tulemustega (B.6 ehk OECD katsejuhend 406) (13), ning seepärast võimaldavad need näidata LLNAga võrreldavat või paremat tulemuslikkust), mis on võetud LLNA tulemuslikkusnõuetesse. Osutatud kemikaalide väljavalimise kriteeriumid olid järgmised:

— võrdluskemikaalide loendis on esindatud aineklassid, mida tavaliselt uuritakse naha sensibiliseerimise suhtes ja mille immuunvastus on vahemikus, mida LLNAga saab mõõta või ennustada;

— kõigi ainete keemiline ehitus on hästi teada;

— iga aine jaoks on olemas meriseal saadud LLNA andmed (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) ning (kus võimalik) inimesel saadud andmed ning

— kõik ained on kaubanduses hästi kättesaadavad.

Soovitatud võrdluskemikaalid on loetletud tabelis 1. Uuringutes, milles soovitatud võrdluskemikaale kasutatakse, tuleks hindamiseks kasutada võrdluskemikaale samades kandeainetes, millega need on loetletud tabelis 1. Kui mõnda loetletud ainet ei ole saada, võib kasutada muid aineid, mis vastavad loetletud valikukriteeriumidele, ja tuleb esitada vajalik põhjendus.

▼M3

Tabel 1

LLNA tulemuslikkusnõuete jaoks soovitatud võrdluskemikaalid

Jrk-nr	Kemikaal (1)	CASi nr	Vorm	Veh (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Tegelik EC3 vahemik	LLNA vs GP	LLNA vs inimene
1	5-kloro-2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon (CMI)/2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-fenüleendiamiin	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	koobaltkloriid	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	isoeugenool	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobensotiasool	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	tsitraal	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	eugenool	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	fenüülbensoaat	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	kaneelalkohol	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	imidasolidinüülkarbamiid	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	metüülmetakrülaat	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	klorobenseen	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	isopropanool	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Jrk-nr	Kemikaal ([1])	CASi nr	Vorm	Veh ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Tegelik EC3 vahemik	LLNA vs GP	LLNA vs inimene
16	piimhape	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	metüülsalitsülaat	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	salitsüülhape	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Valikained, millega saab tõendada LLNAga võrreldes paremat tulemuslikkust										
19	naatriumlaurüülsulfaat	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/–	+/–
20	etüleenglükooldimetakrülaat	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14–56	NC	+/–	+/+
21	ksüleen	1330-20-7	Liq	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/ (**)	+/–
22	nikkeldikloriid	7718-54–9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Lühendid: AOO = atsetoon: oliiviõli (4: 1, v/v); CASi nr = Chemical Abstracts Service'i number; DMF = *N,N*-dimetüülformamiid; DMSO = dimetüülsulfoksiid; DNCB = 2,4-dinitroklorobenseen; EC3 = hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul stimulatsiooniindeks on 3; GP = merisea katse tulemus (s.o B.6 või OECD katsejuhis 406) (13); HCA = heksüülkaneelaldehüüd; Liq = vedelik; LLNA = hiire paiksete lümfisõlmede katse tulemus (s.o B.42 või OECD katsejuhis 429) (1); MEK = metüületüülketoon; NA = ei ole kohaldatav, kuna stimulatsiooniindeks on väiksem kui 3; NC = ei ole arvutatud, kuna andmed on saadud üheainsa uuringuga; Sol = tahke aine; Veh = kandeaine.

(*) Oletatakse, et inimese puhul ei ole sensibilisaator, kuna inimnaha tükikese katsete kliinilisi tulemusi ei ole leitud, kõnealust ainet ei ole inimnaha tükikese allergeenide komplektis ja ei ole teatatud ühestki juhtumist, kus aine oleks sensibiliseerinud inimest.

(**) Merisea andmed ei ole kättesaadavad.

([1]) Kemikaalid tuleks valmistada iga päev, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

([2]) Kuna LLNA tulemuslikkust võib mõjutada erinev kandeaine, tuleb kasutada iga võrdluskemikaali jaoks soovitatud kandeainet (24, 32).

([3]) Keskväärtus, kui kättesaadav on rohkem kui üks EC3 väärtus. Negatiivsete ainete (st mille stimulatsiooniindeks on väiksem kui 3) puhul on esitatud kõrgeim uuritud kontsentratsioon.

([4]) Andmete allikana kasutatud LLNA uuringute arv.

([5]) Kaubanduses kättesaadav nimetuse Kathon CG all (CASi nr 55965-84/9), mis on CMI ja MI segu vahekorras 3: 1. Komponentide suhtelised kontsentratsioonid on vahemikus 1,1–1,25 % CMI ja 0,3–0,45 % MI. Inaktiivsed komponendid on magneesiumisoolad (21,5–24 %) ja vasknitraat (0,15–0,17 %), ülejäänud osa on vesi (74–77 %). Kathon CGd saab osta Sigma-Aldrichi ning Rohm and Haas'i (nüüd Dow Chemical Corporation) kaudu.

▼M3

III. **Kindlaksmääratud usaldusväärsus- ja täpsusnõuded**

7. Samalaadse või muudetud LLNA-meetodi täpsus peaks vastama 18 kohustuslikult kasutatava võrdluskemikaali puhul LLNA tulemuslikkusnõuetele või ületama LLNA täpsust. Uus või muudetud meetod peaks võimaldama õige klassifitseerimise jah-või-ei-otsuse alusel. Kuid uus või muudetud meetod ei tarvitse võimaldada õigesti klassifitseerida kõiki kohustuslikku miinimumkogumisse kuuluvaid võrdluskemikaale. Kui näiteks üks nõrkadest sensibiliseerijatest klassifitseeritakse valesti, tuleks samaväärse tulemuslikkuse tõendamiseks kaaluda vale klassifitseerimise põhjenduse ja sobivate lisaandmete esitamist (näiteks katsetulemused, millega saadakse õige klassifikatsioon muude ainete puhul, mille füüsikalised, keemilised ja sensibiliseerivad omadused sarnanevad valesti klassifitseeritud aine omadega). Sellisel juhul hinnatakse uue või muudetud LLNA-meetodi valideerituse staatust konkreetsete juhtude alusel.

Laborisisene reprodutseeritavus

8. Laborisisese reprodutseeritavuse määramiseks tuleks uut või muudetud LLNA-meetodit hinnata, kasutades sensibiliseerivat ainet, mida on LLNA-meetodiga hästi uuritud. Seepärast on LLNA tulemuslikkusnõuete saavutamise hindamisel aluseks heksüülkaneelaldehüüdi (HCA) korduva mõõtmise tulemuste varieeruvus. Laborisisese usaldusväärsuse hindamiseks tuleb saada HCA hinnangulise lävikontsentratsiooni (ECt) väärtused neljast eraldi katsest, mis tehakse vähemalt nädalase vahega katsete vahel. Laborisisene reprodutseeritavus on vastuvõetav, kui laboris suudetakse iga HCA katse puhul saada ECt väärtused vahemikus 5–20 %, mis vastab 10 % HCA jaoks LLNAga kindlaks tehtud EC3 vahemikule poolest keskväärtusest kuni kahekordse keskväärtuseni (vt tabel 1).

Laboritevaheline reprodutseeritavus

9. Laboritevahelise reprodutseeritavuse määramiseks tuleks uut või muudetud LLNA-meetodit hinnata, kasutades kahte sensibiliseerivat ainet, mida on LLNA-meetodiga hästi uuritud. LLNA tulemuslikkusnõuete saavutamise hindamisel on aluseks HCA ja 2,4-dinitroklorobenseeni (DNCB) mõõtmise tulemuste varieeruvus eri laborites. ECt väärtused tuleks määrata sõltumatult ühest uuringust, mis tehakse vähemalt kolmes eri laboris. Vastuvõetava laboritevahelise reprodutseeritavuse tõendamiseks peaks iga labor saama HCA puhul ECt väärtused vahemikus 5–20 % ja DNCB puhul vahemikus 0,025–0,1 %, mis vastab kindlakstehtud EC3 vahemikule poolest keskväärtusest kuni kahekordse keskväärtuseni; LLNAga määratud keskväärtus on HCA puhul 10 % ja DNCB puhul 0,05 % (vt tabel 1).

▼M3

2. liide

Mõisted

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (14).

Võrdlusaine: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalis-keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusus soovitavas immuunvastuse tugevuse vahemikus.

Hinnanguline lävikontsentratsioon (ECt): uuritava aine hinnanguline kontsentratsioon, mis põhjustab sellise stimulatsiooniindeksi, mis tõendab positiivse immuunvastuse olemasolu.

Hinnanguline SI 3 kontsentratsioon (EC3): uuritava aine hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul stimulatsiooniindeks on kolm.

Valenegatiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega.

Valepositiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeta.

Oht: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

Laboritevaheline reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu uuritavaid aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (14).

Laborisisene reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (14).

Mina-kah-meetod: kõnekeelne väljend katsemeetodi kohta, mis on struktuuriliselt ja tööpõhimõttelt sarnane valideeritud ja aktsepteeritud võrdlusmeetodiga. Sellist katsemeetodit võib valideerida kiirendatud korras (*catch-up validation*). Kasutatakse vaheldumisi samalaadsete katsemeetodite puhul (14).

Võõrväärtus: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

Tulemuslikkusnõuded: valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kuivõrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda tööpõhimõttelt ja teostuslikult sarnase meetodiga. Arvesse võetakse järgmist: i) katsemeetodi olulised osad; ii) valideeritud standardmeetodi tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloend ja iii) võrreldavad täpsuse ja usaldusväärsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (14).

Kaitstud katsemeetod: katsemeetod, mille kasutamine ja levitamine on piiratud patentide, autoriõiguse, kaubamärgi vm sellisega.

▼**M3**

Kvaliteedi tagamine: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korrast kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

Võrdluskemikaalid: valideerimisel kasutamiseks välja valitud kemikaalid, mille esilekutsutavad immuunvastused *in vitro* või *in vivo* võrdlussüsteemis või huvipakkuva loomaliigi puhul on juba teada. Sellised kemikaalid peaksid esindama kemikaaliklasse, mille ainete puhul katsemeetodit eeldatavalt kasutatakse, ja samuti selliste ainete põhjustatava immuunvastuse kogu vahemikku, tugevast mõjust nõrga mõjuni ja mõju puudumiseni. Valideerimise eri staadiumide jaoks, samuti eri katsemeetodite ja kasutusalade puhul võidakse nõuda võrdluskemikaalide eri kogumite kasutamist (14).

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat efekti, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, millisel määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist efekti. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi õigsuse (sisulise kooskõlalisuse) kaalutlusi (14).

Usaldusväärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (14).

Naha sensibiliseerimine: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontaktsensibiliseerimiseks.

Stimulatsiooniindeks (SI): arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

Uuritav aine (uuritav kemikaal): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideeritud katsemeetod: katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul (14).

▼B

B.43. **NEUROTOKSILISUSE UURING NÄRILISTEL**

1. **MEETOD**

Käesolev meetod on samaväärne OECD TG 424ga (1997).

Käesolev katsemeetod on välja töötatud sellise teabe saamiseks, mis on vajalik kemikaalide võimaliku neurotoksilisuse kinnitamiseks või täiendavaks iseloomustamiseks täiskasvanud loomadel. Seda saab kombineerida olemasolevate, korduva annusega toksilisuse uuringute katsemeetoditega või sooritatakse eraldi uuringuna. On soovitav, et OECD neurotoksilisuse uurimise strateegiaid ja meetodeid käsitleva juhisdokumendi (1) osas peetaks nõu, et aidata välja töötada käesoleval katsemeetodil põhinevaid uuringuid. See on eriti tähtis siis, kui võetakse arvesse käesoleva meetodi rutiinseks kasutamiseks soovitatud vaatluste ja katsemenetluste muudatusi. Juhisdokument on koostatud, et hõlbustada muude, teatavates olukordades kasutatavate katsemenetluste valikut.

Käesoleva meetodi abil ei hinnata arenguga seotud neurotoksilisust.

1.1 SISSEJUHATUS

Kemikaalide toksiliste omaduste hindamisel on oluline arvesse võtta võimalikke neurotoksilisi mõjusid. Juba korduvate annustega süsteemset toksilisust uuriv katsemeetod hõlmab vaatlusi, mis skriinivad võimalikku neurotoksilisust. Käesolevat katsemeetodit võib kasutada sellise uuringu väljatöötamiseks, mille abil saadakse lisateavet või kinnitust täheldatud neurotoksiliste mõjude kohta korduva annusega süsteemse toksilisuse uuringutes. Kemikaalide teatavate klasside võimaliku neurotoksilisuse arvessevõtmine võib viidata sellele, et neid võib sobivamalt hinnata, kasutades meetodid ilma eelnevalt korduva annusega neurotoksilisuse uuringutest saadud võimalike neurotoksilisuse märkideta. Selliste kaalutluste hulka kuuluvad nt:

— neuroloogiliste märkide või neuropatoloogiliste kahjustuste jälgimine muudes toksilisuse uuringutes kui korduva annusega süsteemse toksilisuse uuringud või

— struktuuriline samalaadsus või muu teave, mis seob kemikaalid tuntud neurotoksiliste ainetega.

Lisaks sellele võib olla muid näiteid, kui käesoleva katsemeetodi kasutamine on vajalik, vt täiendavad üksikasjad viites (1).

Käesolev meetod on välja töötatud selliselt, et seda saab kohandada vastavalt erilistele vajadustele, mis kinnitavad kemikaalide teatavat histopatoloogilist ja käitumusega seotud neurotoksilisust ning iseloomustavad ja kvantifitseerivad neurotoksilisi reaktsioone.

▼B

Varem võrdsustati neurotoksilisust neuropaatiaga, millega kaasnevad neuropatoloogilised kahjustused või neuroloogilised väärtalitlused nagu atakk, halvatus või värin. Kuigi neuropaatia on neurotoksilisuse tähtis ilming, on nüüd selge, et on palju muid närvisüsteemi mürgistusnähte (nt motoorse koordinatsiooni kadumine, sensoorsed puudujäägid, õppimis- ja mäluhäired), mida ei pruugita kajastada neuropaatias või muud liiki uuringutes.

Käesolev neurotoksilisust uuriv katsemeetod on välja töötatud närvikäitumis- ja neuropatoloogiliste häirete tuvastamiseks täiskasvanud närilistel. Kuigi käitumishäired, isegi juhul, kui morfoloogilised muutused puuduvad, võivad peegeldada negatiivset mõju organismile, ei ole mitte kõik käitumismuutused närvisüsteemile omased. Seetõttu tuleks täheldatud muutusi hinnata koostoimes nii korrelatiivsete histopatoloogiliste, hematoloogiliste või biokeemiliste andmetega kui ka muud süsteemse toksilisuse liiki käsitlevate andmetega. Käesoleva meetodiga ettenähtud neurotoksiliste reaktsioonide iseloomustamiseks ja kvantifitseerimiseks tehtav uurimine hõlmab histopatoloogilisi ja käitumisega seotud menetlusi, mida võivad toetada elektrofüsioloogilised ja/või biokeemilised uuringud (1, 2, 3, 4).

Neurotoksilised ained võivad toimida närvisüsteemi mitmetele osadele ja paljude mehhanismide kaudu. Kuna ükski katsesari ei ole võimeline põhjalikult hindama kõikide ainete neurotoksilist võimet, võib osutuda vajalikuks kasutada muid *in vivo* või *in vitro* katseid, mis on omased täheldatud või ootuspärase neurotoksilisuse liigile.

Käesolevat katsemeetodit võib samuti kasutada koostoimes OECD neurotoksilisuse uurimise strateegiat ja meetodeid käsitlevas juhisdokumendis (1) sätestatud juhistega, et töötada välja uuringud, mis on ette nähtud täiendavaks kirjeldamiseks või annus-reaktsiooni kvantifikatsiooni tundlikkuse suurendamiseks, et paremini hinnata täheldamata negatiivse mõju määra või kinnitaksid kemikaali teadaolevaid või kahtlustatavaid ohte. Näiteks võib välja töötada uuringud, millega neurotoksilisi mehhanisme identifitseeritakse ja hinnatakse või täiendatakse andmeid, mis on saadud juba põhiliste närvi-käitumis- ja neuropatoloogiliste vaatlusprotseduuride kasutamisel. Sellistes uuringutes ei ole vaja hankida andmeid, mis on saadud juba käesoleva meetodi poolt soovitatud standardmenetluste kasutamisel, kui sellised andmed on juba olemas ja neid ei peeta vajalikuks uuringu tulemuste tõlgendamisel.

Käesolev neurotoksilisuse uuring, kas eraldi või millegagi koos kasutades, annab sellist teavet, mida saab:

— kindlaks teha, kas närvisüsteem on alaliselt või pöörduvalt uuritud kemikaali tõttu kahjustatud;

— aidata kaasa selliste närvisüsteemi muutuste iseloomustamisele, mis on seotud kemikaalidega kokkupuutega ja aluseks oleva mehhanismi mõistmisele;

▼B

— kindlaks määrata annuse ja selle reaktsiooni ning aja ja reaktsiooni suhted, et hinnata täheldamata negatiivse mõju määra (mida saab kasutada kemikaalide ohutuskriteeriumide loomisel).

Käesolevas katsemeetodis manustatakse katseainet suu kaudu. Võib kasutada ka muid manustamisteid (nt naha kaudu või sisse hingates), kuid see võib eeldada soovitatud protseduuride muutmist. Manustamistee valiku kaalutlused sõltuvad inimeste kokkupuute profiilist ja olemasolevast toksikoloogilisest või kineetilisest teabest.

1.2. MÕISTED

Kahjulik mõju – selline töötlemisega seotud muutus algtasemest, mis vähendab organismi võimet ellu jääda, sigida või kohaneda keskkonnaga.

Annus – manustatava katseaine kogus. Annust väljendatakse massina (g, mg) või katseaine massina katselooma massiühiku kohta (nt mg kg kohta) või konstantsete toidukontsentratsioonidega (ppm).

Annustamine – üldmõiste, mis hõlmab annust, annustamise sagedust ja kestust.

Neurotoksilisus – negatiivne muutus närvisüsteemi struktuuris ja funktsioonis, mis tuleneb kemikaali, bioloogilise või füüsilise mõjuritega kokkupuutest.

Neurotoksiline aine – kemikaal, bioloogiline või füüsiline mõjur, mis võib põhjustada neurotoksilisust.

NOAEL – lühend täheldamata-kahjuliku-mõju määra kohta ja see on kõrgeim annusmäär, kus ei ole täheldatud kahjulikke, katse tegemisega seotud leide.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Katsekemikaali manustatakse suu kaudu erinevat annustena laborinäriliste mitmele rühmale. Korduvad annused on tavaliselt eeldatud, ning annustamisrežiim võib olla 28 päeva, subkrooniline 90 päeva või krooniline üks aasta või kauemgi. Käesolevas katsemeetodis sätestatud menetlusi võib samuti kasutada ägeda neurotoksilisuse uuringuks. Loomi uuritakse, et tuvastata või iseloomustada käitumise ja/või neuroloogilisi kõrvalekaldeid. Igal vaatlusperioodil hinnatakse neurotoksiliste ainete mõjutatud hulka kattumisi. Katse lõpus osale loomadest (igas katserühmast, mõlemast soost) tehakse *in situ* perfusioon ning ajust, seljaajust ja perifeersetest närvidest prepareeritakse lõiked ja neid uuritakse.

Kui uuring tehakse eraldi uuringuga neurotoksilisuse skriinimiseks või neurotoksiliste mõjude iseloomustamiseks, võib kasutada igast rühmast loomi, keda ei kasutatud perfusioonil ja hiljem histopatoloogilisel uuringul (vt tabel 1), teatavate närvi-käitumis-, neuropatoloogilistel, neurokeemilistel või elektrofüsioloogilistel protseduuridel käesoleva meetodi (1) poolt nõutavatest standarduuringutest saadud andmete täiendamiseks. Need täiendavad protseduurid võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused või oodatavad mõjud viitavad kemikaali neurotoksilisuse teatavale liigile või sihtmärgile. Alternatiivselt võib kasutada allesjäänud loomi sellistel hindamistel, mis on ette nähtud närilistega tehtavate korduva annusega toksilisuse uuringute katsemeetodites.

▼B

Kui käesoleva katsemeetodi protseduure kombineeritakse muude katsemeetodite protseduuridega, on vaja piisavalt loomi mõlemate uuringute vaatluste nõuete rahuldamiseks.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Loomaliikide valik**

Eelistatud näriliste liik on rotid, kuigi võib põhjenduse korral kasutada ka näriliste teisi liike. Rakendatakse noorte täiskasvanute ja tervete loomade enimkasutatavaid laboritüvesid. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Annustamist tuleks alustada tavaliselt nii kiiresti kui võimalik pärast võõrutamist, soovitavalt mitte enne, kui loomad on kuuenädalased, ja igal juhul enne, kui loomad on üheksanädalased. Kui käesolevat uuringut siiski kombineeritakse muude uuringutega, on vaja kohandada vanusenõuet. Uuringut alustades peaks loomade massi muutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada ± 20 % iga soo keskmisest massist. Kui tehakse korduva annusega lühiajaline uuring pikaajalise uuringu alguuringuna, tuleks kasutada mõlemas uuringus samast liinist ja sama päritolu loomi.

1.4.2. **Loomade pidamise ja toitmise tingimused**

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitavalt ei ületa 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal, siis eesmärgiks on seda hoida vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Valju katkendlikku heli tuleks vältida. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatu hulga joogiveega. Toiduvalikut võib mõjutada vajadus tagada katseaine sobiv lisamine, kui katseainet manustatakse käesoleva meetodi abil. Loomi võib hoida eraldi või väikestes samast soost loomade rühmades.

1.4.3. **Loomade ettevalmistamine**

Terved noored loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt ja hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne uurimuse alustamist, et võimaldada laboritingimustega kohanemist.

1.4.4. **Manustamisviis ja annuste ettevalmistamine**

Käesolevas katsemeetodis manustatakse katseainet suu kaudu. Suu kaudu saab manustada sondi abil, toiduga, joogiveega või kapslitena. Võib kasutada ka muid manustamisviise (nt naha kaudu või sisse hingates), kuid see võib eeldada soovitatud protseduuride muutmist. Manustamisviisi valiku kaalutlused sõltuvad inimeste kokkupuute omadustest ja olemasolevast toksikoloogilisest või kineetilisest teabest. Tuleks ära märkida põhjendus manustamisviisi valimiseks ning käesoleva meetodi protseduuride muudatuste tegemiseks.

▼B

Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse katseaine sobivas kandeaines. On soovitav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ja siis võimalikku muude kandealuste lahust/suspensiooni. Kandeaine toksilised omadused peaksid olema teada. Lisaks sellele tuleks arvesse võtta järgmisi kandeaine omadusi: katseaine absorbtsiooni, jaotamist, metabolismi või peetumist käsitlevad mõjud; katseaine keemilisi omadusi käsitlevad mõjud, mis võivad muuta toksilisi omadusi; ning loomade toidu- või veetarbimist või toitumust käsitlevad mõjud.

1.5. PROTSEDUURID

1.5.1. **Loomade arv ja sugu**

Kui uuring tehakse eraldi uuringuga, tuleks kasutada vähemalt 20 looma (10 emaslooma ja 10 isaslooma) igas annus- ja kontrollrühmas üksikasjalike kliiniliste ja funktsionaalsete vaatluste hindamiseks. Vähemalt viiele isasloomale ja viiele emasloomale, kes on valitud nimetatud 10 isaslooma ja 10 emaslooma hulgast, teha perfusioon in situ ja kasutada neid üksikasjalikus neurohistopatoloogilises uuringus katse lõpus. Juhul, kui vaadeldakse üksnes piiratud arvu antud annusrühmas olevaid loomi neurotoksiliste mõjude tunnuste osas, tuleks arvesse võtta nimetatud loomade lisamist nende hulka, kes valitakse perfusiooniks. Kui uuring tehakse koos korduva annusega toksilisuse uuringuga, tuleks kasutada piisavalt loomi mõlema uuringu eesmärkide täitmiseks. Loomade minimaalne arv iga rühma kohta erinevate uuringute kombinatsioonides on toodud tabelis 1. Kui osa loomades surmatakse uuringu kestel või suunatakse toibuvatest loomadest koosnevasse rühma toksiliste mõjude pöörduvuse, püsivuse või hilisema esinemise vaatlemiseks katse järel või kui kaalutakse täiendavaid vaatlusi, siis tuleks suurendada loomade arvu, tagamaks, et vaatluseks ja histopatoloogilisteks uuringuteks oleks kättesaadav nõutav arv loomi.

1.5.2. **Katse- ja kontrollrühm**

Tuleks kasutada vähemalt kolme katse- ja kontrollrühma, kuid kui muude andmete hindamisel ei eeldata ühtegi mõju korduva annusega 1 000 mg kg kehamassi kohta päevas, võib teha piirkatse. Kui puuduvad sobivad andmed, tuleks teha annuse piirkonna määramise katse, et aidata kindlaks määrata kasutatavaid annuseid. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neile ei anta uuritavat ainet. Kui kandeainet kasutatakse katseaine manustamisel, peaks kontrollrühm saama kandeainet suurima kasutatud kogusena.

1.5.3. **Usaldusväärsuse kontroll**

Uuringut teostav labor peaks esitama andmed oma võime kohta teostada uuringut ja kasutatud protseduuride tundlikkuse kohta. Sellised andmed peaksid tõendama võimet tuvastada ja kvantifitseerida muutusi lõpp-punktides, mille vaatlemist soovitatakse. Nendeks on autonoomsed sümptomid, sensoorne reaktiivsus, jäseme haardejõud ja motoorne aktiivsus. Teave kemikaalide kohta, mis põhjustavad erinevat liiki neurotoksilisi reaktsioone ja mida võib kasutada positiivsete kontrollainetena, võib leida viidetes 2–9. Varasemaid andmeid võib kasutada, kui katsemenetluste olulised aspektid jäävad samaks. Varasemate andmete perioodiline ajakohastamine on soovitav. Protseduuride jätkuvat tundlikkust tõendavad uued andmed tuleks luua, kui katset sooritav labor on muutnud katse tegemise mõningaid olulisi osasid või menetlusi.

▼B

1.5.4. **Annuse valik**

Annusemäärade valimisel tuleks võtta arvesse kõiki katseühendi või sellega seotud ainete saadaolevaid varem saadud toksilisuse ja kineetilisi andmeid. Kõrgeim annusemäär tuleks valida eesmärgiga põhjustada neurotoksilisi mõjusid või selgeid süsteemseid toksilisi mõjusid. Tuleks valida annusmäärade alanev järjestus, eesmärgiga näidata annusega seotud reaktsiooni ja mittetäheldatud kahjulikku mõju (NOAEL) väikseima annusemäära puhul. Põhimõtteliselt tuleks annusemäärad kehtestada nii, et saaks eristada algseid toksilisi mõjusid närvisüsteemile süsteemse toksilisusega seotud mõjudest. Kahe- või kolmekordsed vahemikud on sageli optimaalsed ning sageli on eelistatud neljanda katserühma lisamine väga suurte vahemike (nt üle kümnekordne tegur) annuste vahel. Kui inimese vastuvõtlikkuse kohta on olemas mõistlik hinnang, tuleks seda arvesse võtta.

1.5.5. **Piirkatse**

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 1 000 mg kg kehamassi kohta, kasutades kirjeldatud protseduure, ei põhjusta täheldatavaid neurotoksilisi mõjusid ja kui toksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt lähedaste ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uuringut vajalikuks. Inimeste ootuspärane kokkupuude võib viidata piirkatses kasutavatest suukaudsetest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele. Muude manustamisviiside korral, nagu näiteks sissehingamine või naha kaudu manustamine, võivad katseaine füüsikalis-keemilised omadused tihti viidata suurimale kokkupuutetasemele. Ägeda suukaudse uuringu tegemiseks peaks piirkatse annus olema vähemalt 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Annuste manustamine**

Loomadele annustatakse katseainet kord päevas, seitse päeva nädalas, vähemalt 28 päeva; viiepäevase annustamisrežiimi või lühema kokkupuute perioodi kasutamist on vaja põhjendada. Katseainet manustatakse ühekordse annusena sondi abil söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil. Vedeliku suurim kogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus ei tohiks ületada 1 ml/100 g kehamassi kohta. Vesilahuste puhul võib siiski manustada 2 ml/100 g kehamassi kohta. Arvesse võtmata ärritavaid või söövitavaid aineid, mille mõjud tavaliselt halvenevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katsekoguse varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

Toidu või joogivee kaudu manustatud ainete puhul on oluline tagada, et hõlmatud katseaine kogused ei häiriks tavapärast toitumist või veetasakaalu. Kui katseainet manustatakse toiduga kas püsiva toidukontsentratsioonina (ppm) või võidakse kasutada püsivat annusemäära looma kehamassi suhtes, siis tuleb täpsustada kasutatud alternatiivi. Sondi kaudu manustatud aine puhul tuleks annus anda samal kellaajal iga päev ja kohandada vähemalt igal nädalal, et säilitada konstantne annusemäär looma kehamassi suhtes. Kui korduva annusega uuringut tehakse pikaajalise uuringu alguuringuga, tuleks kasutada mõlemas uuringus sama toitu. Erandkorras, kui ühekordne annus ei ole võimalik, manustatakse annust väiksemates osades kuni 24 tunni jooksul.

▼B

1.6. VAATLUSED

1.6.1. **Vaatluste ja katsete sagedus**

Korduva annusega uuringutes peaks vaatlusperiood hõlmama annustamisperioodi. Akuutsetes uuringutes tehakse vaatlusi katse järel 14 päeva. Satelliitrühma kuuluvate loomade puhul, keda hoitakse kokkupuutumise eest katsejärgsel perioodil, peaks vaatlused hõlmama sama perioodi.

Vaatlusi tuleks teha piisavalt sageli, et suurendada mis tahes käitumisega seotud ja/või neuroloogiliste kõrvalekallete tuvastamise tõenäosust. Vaatlusi peaks tegema soovitavalt sama ajal iga päev, võttes arvesse oodatavate mõjude kõrghetke pärast annustamist. Kliiniliste vaatluste ja funktsionaalsete katsete sagedus on esitatud kokkuvõtlikult tabelis 2. Kui varasematest uuringutest saadud kineetilised või muud andmed viitavad vajadusele kasutada erinevaid vaatlus-, katse- või vaatlusjärgseid aja hetki, tuleks vastu võtta alternatiivne ajakava maksimaalse teabe saamiseks. Ajakava muudatuste kohta tuleks esitada põhjendus.

1.6.1.1. *Üldise tervisliku seisundi ja suremuse/haigestumuse vaatlused*

Kõiki loomi tuleks hoolikalt vaadelda vähemal kord päevas nende tervisliku seisundit arvesse võttes ning vähemalt kaks korda päevas haigestumuse ja suremuse osas.

1.6.1.2. *Üksikasjalikud kliinilised vaatlused*

Üksikasjalikud kliinilised vaatlused tuleks teha kõikide loomade kohta, kes on valitud sel eesmärgil (vt tabel 1), üks kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada sama katselooma käsitlevaid võrdlusi) ja seejärel erinevate ajavahemike tagant, sõltuvalt uuringu kestusest (vt tabel 2). Üksikasjalikud kliinilised vaatlused toibuvate loomade satelliitrühmade kohta tuleks teha toibumisperioodi lõpus. Üksikasjalikud kliinilised vaatlused tuleks teha looma oma puurist väljaspool standardalal. Neid peaks hoolikalt registreerima, kasutades punktisüsteeme, mis hõlmavad kriteeriume või punktiskaalasid iga vaatluse käigus tehtava mõõtmise kohta. Kasutatavad kriteeriumid või skaalad tuleks selgesõnaliselt määratleda katselabori poolt. Tuleb püüda tagada, et muutused katsetingimustes oleksid minimaalsed (mitte süsteemselt seotud katsega) ning et vaatlusi teeks koolitatud vaatlejad, kes ei ole teadlikud tegelikust käsitlemisest.

On soovitav, et vaatlusi tehtaks struktuurselt, et täpselt määratletud kriteeriume (kaasa arvatud määratlus „normaalne vahemik”) kohaldatakse süsteemselt iga looma suhtes igal vaatlusel. Normaalne vahemik tuleks adekvaatselt dokumenteerida. Kõik täheldatud sümptomid tuleks registreerida. Kui see on teostatav, tuleks registreerida ka täheldatud sümptomite suurus. Kliinilised vaatlused peaksid hõlmama, kuid mitte ainult, naha, karvkatte, silmade, limaskestade, eritiste esinemise ja autonoomse aktiivsuse (nt pisaravool, piloerektsioon, pupilli suurus, ebatavaline hingamismudel ja/või suu kaudu hingamine (lõõtsutamine), kõik urineerimise või roojamisega seotud ebatavalised sümptomid ning uriini värvumine) muutusi.

▼B

Kõik ebatavalised reaktsioonid seoses kehaasendi, aktiivsuse astme (nt standardala vähenenud või suurenenud uurimine) ning liigutuste koordinatsiooniga tuleks samuti üles märkida. Muutused kõnnakus (nt taarumine, ataksia), kehaasendis (nt küürus selg) ning käsitlemise, asetamise või muude keskkonnaga stiimulitega seotud reaktiivsuses ning klooniliste või tooniliste liigutuste, krampide või värinate esinemine, stereotüübid (nt ülemäärane sugemine, ebatavalised pea liigutused, korduv tiirutamine) või veider käitumine (nt hammustamine või ülemäärane lakkumine, enesesandistamine, tagurpidi kõndimine, häälitsemine) või agressiivsus tuleks registreerida.

1.6.1.3. *Funktsionaalsed katsed*

Sarnaselt üksikasjalikele kliinilistele vaatlustele, tuleks funktsionaalsed katsed samuti teostada üks kord enne kokkupuudet ja seejärel sageli kõiki loomadega, kes on sel eesmärgil välja valitud (vt tabel 1). Funktsionaalsete katsete tegemise sagedus on samuti sõltuv uuringu kestuses (vt tabel 2). Lisaks tabelis 2 sätestatud vaatlusperioodidele tuleks funktsionaalsed vaatlused toibuvate loomade satelliitrühmade suhtes samuti teha võimalikult lähedal lõplikule surmamisele. Funktsionaalsetes katsetes peaks käsitlema sensoorset reaktiivsust erinevatele stiimulitele (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptoorsed stiimulid (5, 6, 7)), jäseme haardejõu hindamine (8) ja motoorse tegevuse hindamine (9). Motoorset tegevust tuleks mõõta automaatseadme abil, mis on võimeline avastama nii tegevuse vähenemise kui suurenemise. Kui kasutatakse muud kindlaksmääratud süsteemi, peaks see olema kvantitatiivne ning selle tundlikkus ja usaldusväärsus peaksid olema tõendatud. Iga seadet tuleb testida selle usaldusväärsuse tagamiseks aja jooksul ja seadmete vastavuse tagamiseks. Järgitavate protseduuride täiendavad üksikasjad on toodud vastavates viidetes. Kui puuduvad andmed (nt struktuuraktiivsus, epidemioloogilised andmed, muud toksikoloogilised uuringud), mis viitaksid võimalikele neurotoksiliste mõjudele, tuleks kaaluda sensoorseid ja motoorseid funktsioone või õppimist ja mälu uurivate täpsemate katsete lisamist nimetatud võimalike mõjude uurimiseks üksikasjalikumalt. Viites 1 on esitatud rohkem teavet täpsemate katsete ja nende kasutamise kohta.

Erandkorras, loomad, kel ilmnevad mürgistusnähud sellises ulatuses, et see oluliselt häiriks funktsionaalse katse sooritamist, võib katsest välja jätta. Tuleks esitada loomade funktsionaalsest katsest väljajätmise põhjendus.

1.6.2. **Kehamass ja toidu/vee tarbimine**

Kuni 90päevaste uuringute puhul tuleks loomi kaaluda vähemalt kord nädalas ja mõõtmisi tuleks teha toidu tarbimise kohta (vee tarbimine, kui katseainet manustatakse nimetatud keskkonnas) vähemalt kord nädalas. Pikaajaliste uuringute puhul tuleks kaaluda kõiki loomi vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala jooksul ja seejärel vähemalt kord iga 4 nädala tagant. Mõõtmisi toidu tarbimise kohta (vee tarbimine, kui katseainet manustatakse nimetatud keskkonnas) tuleks teha vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala jooksul ja seejärel ligikaudu kolmekuuliste intervallide tagant, välja arvatud juhul, kui tervislik seisundi või kehamassi muutumine näeb ette teisiti.

▼B

1.6.3. **Oftalmoloogia**

Pikemate kui 28päevaste uuringute puhul tuleks teha oftalmoloogiline uuring, kasutades oftalmoskoopi või samalaadset sobivat instrumenti, enne katseaine manustamist ja katse lõpetamisel, eelistatavalt kõikide loomadega, kuid vähemalt loomadega, kes on suure annusemääraga või kontrollrühmades. Kui avastatakse muutused silmades või kui kliinilised tunnused viitavad selle vajadusele, tuleks uurida kõiki loomi. Pikaajaliste uuringute puhul tuleks teha oftalmoloogiline uuring 13 nädala jooksul. Oftalmoloogilisi uuringuid ei ole vaja teha, kui selle kohta on juba olemas andmed, mis on saadud muudest, sarnase kestusega ja samalaadse annusemääraga uuringutest.

1.6.4. **Hematoloogia ja kliiniline biokeemia**

Kui neurotoksilisuse uuring tehakse koos korduva annusega süsteemse toksilisuse uuringuga, tuleks teha hematoloogilised uuringud ja kliinilise biokeemia määramised vastavalt süsteemse toksilisuse uuringu asjaomasele meetodile. Proove tuleks koguda selliselt, et vähendatakse kõiki võimalikke mõjusid neuroloogilisele käitumisele.

1.6.5. **Histopatoloogia**

Neuropatoloogiline uuring tuleks välja töötada uuringu in *vivo* etapis tehtud vaatluste täiendamiseks ja laiendamiseks. Proovid vähemalt viie looma kudedest soo ja rühma kohta (vt tabel 1 ja järgmine lõige) fikseeritakse in situ, kasutades üldtunnustatud perfusiooni- ja fiksatsioonitehnikat (vt 3. viite 5. peatükk ja 4. viite 50. peatükk). Kõik täheldatavad suured muutused tuleks registreerida. Kui uuringut teostatakse eraldi uuringuga neurotoksilisuse skriinimiseks või neurotoksiliste mõjude iseloomustamiseks, võib kasutada ülejäänud loomi kas teatavate neuroloogilise käitumisega seotud (10, 11), neuropatoloogilistes (10, 11, 12, 13), neurokeemilistes (10, 11, 14, 15) või elektrofüsioloogilistes (10, 11, 16 17) protseduurides, mis võivad täiendada siin kirjeldatud protseduure ja uuringuid, või kasutada histopatoloogias uuritavate subjektide arvu suurendamiseks. Need täiendavad protseduurid võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused või oodatavad mõjud viitavad kemikaali neurotoksilisuse (2, 3) teatavale liigile või sihtmärgile. Alternatiivselt võib ülejäänud loomi samuti kasutada rutiinsetes patoloogilistes hindamistes, nagu on kirjeldatud korduvate annustega uuringute meetodis.

Kõik parafiini valatud koeproovid värvitakse üldise värvimisprotseduuri abil, nt hematoksüliin ja eosiin (H&E), ning neid uuritakse mikroskoopiliselt. Kui täheldatakse või kahtlustatakse perifeerse neuropaatia sümptomeid, tuleks uurida plastikusse valatud perifeerse närvikoe proove. Kliinilised tunnused võivad anda põhjust uute kohtade uurimisele või eriliste värvimismenetluste kasutamisele. Viidetes (3) ja (4) on antud juhised täiendavate uuringukohtade kohta. Samuti võivad sobivad erivärvid olla abiks teatud liiki patoloogilistele muutustele viitamisel (18).

▼B

Kesk- ja perifeerse närvisüsteemi representatiivsed lõike tuleks uurida histoloogiliselt (vt 3. viite 5. peatükk ja 4. viite 50. peatükk). Uuritavad alad peaksid tavaliselt sisaldama järgmist: eesaju, suuraju keskosa, sh hipokampi läbiv lõige, keskaju, väikeaju, ajusild, piklikaju, silm koos nägemisnärviga ja võrkkestaga, seljaaju kaela- ja nimmetüve kohal, spinaalganglion, spinaal- ja ventraalnärvikiud, proksimaalne istmikunärv, proksimaalne säärenärv (põlves) ja säärenärvipoolsed sääremarjalihase harud. Seljaajust ja perifeersest närvist tehtavate lõigete hulka kuuluvad nii rist- kui pikilõiked. Tähelepanu tuleks pöörata närvisüsteemi veresoonestikule. Samuti tuleks uurida skeletilihasest, eelkõige sääremarjalihasest võetud proovi. Erilist tähelepanu tuleks pöörata kesk- ja perifeerse närvisüsteemi kohtadele, mille raku- ja kiustruktuur ja -tüüp on teatavasti eriti mõjutatud neurotoksiliste ainete poolt.

Viidetes 3 ja 4 on toodud selliseid neuropatoloogilisi muutusi käsitlev juhend, mida põhjustab kokkupuude toksiliste ainetega. Etapiviisiline koeproovide uuring on soovitav, milles võrreldakse esmalt suure annusega rühma lõikeid kontrollrühma lõigetega. Kui ei ole täheldatud neuropatoloogilisi muutusi nimetatud rühmade proovides, ei ole vaja teha hilisemaid analüüse. Kui neuropatoloogilisi muutusi on täheldatud suure annusega rühmas, tuleks seejärel keskmiste ja väikese annusega rühma igast võimalikust mõjutatud koest võetud proovid kodeerida ja hiljem neid uurida.

Kui leitakse tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta kvalitatiivses uuringus, siis tuleks teha teine uuring kõikides närvisüsteemi piirkondades, kus nimetatud muutused esinevad. Kõikide annuserühmade igast võimalikust mõjutatud piirkonnast võetud lõiked tuleks kodeerida ja neid tuleks uurida juhuslikult ilma koodi teadmata. Iga kahjustuse sagedus ja raskusaste tuleks registreerida. Pärast seda, kui kõikide annuserühmade kõiki piirkondi on hinnatud, saab koodi murda ja teha statistilise analüüsi annuse ja sellele reageerimise suhte hindamiseks. Erineva raskusastmega kahjustuse näiteid tuleks kirjeldada.

Neuropatoloogilisi leide tuleks hinnata käitumisega seotud vaatluste ja mõõtmiste kontekstis ning katseaine varasematest ja praegustest süsteemse toksilisuse uuringutest saadud muude andmete põhjal.

2. TULEMUSED

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Tulemused esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleks esitada kõik andmed kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katse- või kontrollrühma puhul ära loomade arvu katse alguses, katse käigus surnud või humaanselt surmatud loomade arvu ning kõikide surmade või humaansete tapmiste aja, mürgistusnähtude arvu, täheldatud mürgistusnähtude kirjelduse, sh toksiliste mõjude algusaja, kestuse, liigi ja raskuse, kahjustustega loomade arvu, sh kahjustus(t)e liik ja raskus.

▼B

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Uuringu avastusi peaks hindama neuroloogiliste käitumisega seotud ja neuropatoloogiliste mõjude (neurokeemilised või eletkrofüsioloogilised mõjud ning kui lisatakse täiendavad uuringud) esinemissageduse, raskuse ja korrelatsiooni osas ning kõikide muude negatiivsete mõjude osas. Võimaluse korral tuleks hinnata numbrilisi tulemuse sobiva ja üldiselt heakskiidetud statistilise meetodi abil Statistilised meetodid tuleks valida uuringu väljatöötamise ajal.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

— füüsiline laad (sh isomeersus, puhtus ja füüsikalis-keemilised omadused);

— tunnusandmed.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valiku põhjendamine.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/liinid;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, kohanemine, toitumine jne;

— iga looma kaal katse alguses.

Katsetingimused:

— katseaine valmistise/toiduvalmistise üksikandmed, saavutatud kontsentratsioon, valmistise stabiilsus ja homogeensus;

— manustatavate annuste täpsustamine, sh kandeaine, mahu ja manustatava aine füüsilise vormi üksikasjad;

— katseaine manustamise üksikasjad;

— annusemäärade valiku põhjendus;

— põhjendus kokkupuute viise ja kestuse kohta;

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kg kehamassi kohta päevas), vajaduse korral;

— üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta.

Vaatlus ja katsemenetlused:

— üksikasjad igast rühmast loomade määramise kohta perfusiooni alamrühmadesse;

— punktisüsteeme käsitlevad üksikasjad, sh üksikasjalike kliiniliste vaatluste iga mõõtmise kriteeriumid ja punktiskaalad;

▼B

— üksikasjad funktsionaalsete katsete kohta, milles uuritakse sensoorset reaktiivsust erinevatele stiimulitele (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptoorsed stiimulid); hinnatakse jäseme haardejõudu; hinnatakse motoorset tegevust (sh üksikasjad automaatseadmete kohta, mis avastavad tegevust); ja, muude käsutatavate menetluste kohta;

— üksikasjad oftalmoloogiliste uuringute kohta ja vajadusel hematoloogiliste uuringute ning kliinilise biokeemia katsete kohta ning asjaomase lähtetaseme väärtuste kohta;

— üksikasjad teatavate neuroloogiliste käitumisega seotud, neuropatoloogiliste, neurokeemiliste või elektrofüsioloogiliste menetluste kohta.

Tulemused:

— kehamass/kehamassi muutused, sh kehamass surmamise hetkel;

— toidu ja vee tarbimine vajadusel;

— toksilist reaktsiooni käsitlevad andmed ja annusemäär, sh toksilisuse või suremuse sümptomid;

— üksikasjalike kliiniliste vaatluste (pöörduvad või pöördumatud) olemuse, raskuse ja kestuse kohta (algusaeg ja edasine käik);

— funktsionaalsete katsete tulemuste üksikasjalik kirjeldus;

— lahangu leiud;

— vajadusel kõikide neuroloogiliste käitumisega seotud, neuropatoloogiliste ja neurokeemiliste või elektrofüsioloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— andmed absorbtsiooni ja metabolismi kohta (kui seda on mõõdetud)

— vajadusel tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste arutelu:

— teave annuse ja sellele reageerimise kohta;

— muude toksiliste mõjude seos uuritud kemikaali võimaliku neurotoksilisuse kohta tehtud järeldusega;

— täheldamata negatiivse mõju tase.

Järeldused:

— uuritava kemikaali üldist neurotoksilisust käsitlevat erimärget soositakse.

4. **VIITED**

1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4) Spencer, PS. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, PS. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691–704.

7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267–283.

8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (19 79). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., *1,* 233–236.

9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (19 9 2). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12) Broxup, B. (19 91). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689–695.

13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343–352.

14) O'Callaghan, J.P. (19 8 8). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445–452.

15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., *244,* 368–378.

16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp. 299–335.

17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726–742.

18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabel 1

Minimaalne loomade arv rühmas, kui neurotoksilisuse uuringut tehakse eraldi või koos muude uuringutega

	NEUROTOKSILISUSE UURING, MIS ON TEHTUD:			
	eraldi uuringuna	kombineeritud 28päevase uuringuga	kombineeritud 90päevase uuringuga	kombineeritud kroonilise toksilisuse uuringuga
Loomade koguarv rühma kohta	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma	15 isaslooma ja 15 emaslooma	25 isaslooma ja 25 emaslooma
Funktsionaalsete katsete, sh üksikasjalike kliiniliste vaatluste jaoks välja valitud loomade arv	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma
Perfusiooniks *in situ* ja neurohistopatoloogiaks valitud loomade arv	5 isaslooma ja 5 emaslooma	5 isaslooma ja 5 emaslooma	5 isaslooma ja 5 emaslooma	5 isaslooma ja 5 emaslooma
Loomade arv, kes on välja valitud korduva annusega/subkroonilise/kroonilise mürgisuse vaatlustes, hematoloogias, kliinilises biokeemias, histopatoloogias jne, nagu on märgitud vastavates juhendites		5 isaslooma ja 5 emaslooma	10 isaslooma † ja 10 emaslooma †	20 isaslooma † ja 20 emaslooma †
Vajadusel täiendavad vaatlused	5 isaslooma ja 5 emaslooma			

† Siia rühma kuulub viis looma, kes on valitud funktsionaalseks katseks ja üksikasjalilkeks kliinilisteks vaatlusteks neurotoksilisuse uuringu osana.

▼B

Tabel 2

Kliiniliste vaatluste ja funktsionaalsete katsete sagedus

Vaatluste liik		Uuringu kestus			
		Äge	28päevane	90päevane	Krooniline
Kõikidel loomadel	üldine tervislik seisund	kord päevas	kord päevas	kord päevas	kord päevas
	suremus/ haigestumus	kaks korda päevas	kaks korda päevas	kaks korda päevas	kaks korda päevas
Funktsionaalseteks vaatlusteks valitud loomadel	*üksikasjalikud kliinilised vaatlused*	— enne esimest kokkupuudet — 8 tunni jooksul pärast annustamist ajal, mil mõju on hinnanguliselt suurim — 7. ja 14. päeval pärast annustamist	— enne esimest kokkupuudet — seejärel kord nädalas	— enne esimest kokkupuudet — kord esimese ja teise kokkupuutenädala jooksul — seejärel kord kuus	— enne esimest kokkupuudet — kord esimese kokkupuutekuu lõpus — seejärel iga kolme kuu tagant
	Funktsionaalsed katsed	— enne esimest kokkupuudet — 8 tunni jooksul pärast annustamist ajal, mil mõju on hinnanguliselt suurim — 7. ja 14. päeval pärast annustamist	— enne esimest kokkupuudet — neljandal annustamisnädalal võimalikult lähedal kokkupuuteperioodi lõpule	— enne esimest kokkupuudet — kord esimese ja teise kokkupuutenädala jooksul — seejärel kord kuus	— enne esimest kokkupuudet — kord esimese kokkupuutekuu lõpus — seejärel iga kolme kuu tagant

▼B

B.44. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VIVO* MEETOD

1. MEETOD

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 427 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Paljude kemikaalidega puututakse kokku peamiselt naha kaudu, samas kui suurema osa toksikoloogiliste uuringute puhul manustatakse uuritavaid aineid katseloomadele suu kaudu. Käesolevas juhendis kirjeldatud *in vivo* nahakaudse imendumise uuring annab vajaliku seose, millega suukaudse manustamise uuringutest saab teha oletusi aine ohutuse kohta naha kaudu kokkupuutumisel.

Aine peab enne vereringesse jõudmist läbima suure hulga naharakkude kihte. Enamiku ainete puhul määrab sissetungimise kiiruse sarvkiht *(stratum corneum),* mis koosneb surnud rakkudest. Naha läbilaskvus sõltub kemikaali lipofiilsusest ja epidermise välimise kihi paksusest ning ka sellistest teguritest nagu aine molekulmass ja kontsentratsioon. Üldiselt on rottide ja küülikute nahk kergemini läbitav kui inimnahk, samas kui merisigade ja ahvide naha läbitavus sarnaneb inimnaha omale.

Nahakaudse imendumise mõõtmise meetodeid saab jagada kahte kategooriasse: *in vivo ja in vitro*. *In vivo* meetod võib anda usaldusväärset teavet nahakaudse imendumise kohta eri liikide katseloomadel. Viimasel ajal on välja töötatud *in vitro* meetodeid. Nende puhul uuritakse aine tungimist läbi looma või inimese osalise või täispaksusega naha vedelikureservuaari. *In vitro* meetodit on kirjeldatud eraldi teise katsemeetodi all (1). Soovitav on tutvuda OECD juhenddokumendiga nahakaudse imendumise uuringute läbiviimiseks (2); dokument aitab valida kõige sobivama meetodi igas konkreetses olukorras, kuna selles on esitatud rohkem üksikasju nii *in vivo* kui ka *in vitro* meetodi sobivuse kohta.

Käesolevas metoodikas kirjeldatud *in vivo* meetod võimaldab määrata uuritava aine tungimist läbi naha süsteemsesse vereringesse. Kõnealust meetodit on laialdaselt kasutatud palju aastaid (3, 4, 5, 6 ja 7). Kuigi paljudel juhtudel võivad sobida nahakaudse imendumise *in vitro* uuringud, võib esineda ka olukordi, kus ainult *in vivo* uuringuga on võimalik saada vajalikke andmeid.

In vivo meetodi eelis on füsioloogia ja metabolismi seisukohast täieliku süsteemi kasutamine, ühe loomaliigi kasutamine paljude toksilisusuuringute läbiviimiseks ja võimalus meetodit modifitseerida teiste loomaliikidega kasutamiseks. Puudusteks on elusloomade kasutamine, vajadus kasutada usaldusväärsete tulemuste saamiseks radioaktiivselt märgistatud materjali, raskused varase imendumise faasi kindlaksmääramisel ning eelistatava loomaliigi (rott) ja inimese naha läbilaskvuse erinevused. Loomade nahk laseb üldiselt aineid paremini läbi ja seetõttu võidakse imendumist läbi inimnaha üle hinnata (6, 8 ja 9). Leeliselisi/söövitavaid aineid ei tohiks elusloomadel katsetada.

▼B

1.2. MÄÄRATLUSED

Imendumata kogus – kogus, mis pestakse maha naha pinnalt pärast kokkupuudet ja mis leidub difusiooniraku peal asuval kattel, sealhulgas kogus, mille kohta näidatakse, et see lendub nahalt kokkupuute ajal.

Imendunud kogus *(in vivo)* – kogus, mis leitakse uriinis, puuri pesemise vedelikus, roojas, väljahingatud õhus (kui seda mõõdetakse), veres, kudedes (kui neid kogutakse) ja ülejäänud korjuses pärast pealekandmiskoha naha eemaldamist.

Imenduv kogus – kogus, mis jääb nahale või naha sisse pärast pesemist.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine, eelistatavalt radioaktiivselt märgistatud, kantakse looma paljakspügatud nahale ühes või enamas sobivas annuses tavaliselt kasutatava preparaadi kujul. Uuritav valmistis jäetakse ettenähtud ajaks nahaga kokkupuutesse sobiva katte all (mis võib kokkupuutekohta lihtsalt katta, pooltihedalt või tihedalt katta), et vältida uuritava valmistise allaneelamist. Kokkupuute lõppedes eemaldatakse kate ja nahk puhastatakse sobiva puhastusainega; kate ja puhastusmaterjal jäetakse analüüsimise jaoks alles ja pannakse uus kate. Loomi hoitakse enne kokkupuudet, selle ajal ja pärast seda metabolismi uurimise üksikpuurides ning nende perioodide väljaheited ja väljahingatud õhk kogutakse analüüsimiseks. Väljahingatud õhu kogumise võib ära jätta, kui on piisavalt teavet selle kohta, et lenduvat radioaktiivset metaboliiti tekib vähe või üldse mitte. Iga uuringu jaoks võetakse tavaliselt mitu rühma loomi, kes viiakse kokkupuutesse uuritava valmistisega. Üks rühm surmatakse kokkupuuteperioodi lõpus. Teised rühmad surmatakse kindlaksmääratud ajavahemike järel pärast seda (2). Proovivõtuaja lõppedes surmatakse allesjäänud loomad, veri kogutakse analüüsimiseks, uuritava aine pealekandmise koht eemaldatakse analüüsimiseks ja korjust analüüsitakse eritumata materjali määramiseks. Proove analüüsitakse sobivate meetoditega ning hinnatakse nahakaudse imendumise taset (6, 8 ja 9).

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Loomaliigi valimine**

Kõige sagedamini kasutatav loomaliik on rott, kuid kasutada võib ka karvavabasid liine ja liike, kellel nahakaudse imendumise kiirus sarnaneb enam inimese omale (viited 3, 6, 7, 8 ja 9). Kasutada tuleb noori terveid täiskasvanud loomi, kes on ühest soost (tavaliselt isased) ja kuuluvad tavaliselt kasutatavatesse laboriliinidesse. Uuringu alguses ei tohiks katselooma kehakaalu erinevus keskmisest kehakaalust ületada ± 20 %. Näiteks on sobivad 200–250 g kaaluvad isasrotid, eriti selle vahemiku ülemisse poolde kuuluvad loomad.

▼B

1.4.2. **Loomade arv ja sugu**

Iga uuritava valmistise ja iga planeeritud lõpetamisaja kohta tuleb kasutada vähemalt nelja ühest soost looma. Iga loomade grupp surmatakse erinevate ajavahemike möödudes, näiteks kokkupuuteperioodi (tavaliselt 6 või 24 tundi) lõppedes ja sellele järgnevate ajavahemike järel (nt 48 ja 72 tunni möödudes). Kui on andmeid, et nahakaudne toksilisus isas- ja emasloomade suhtes on oluliselt erinev, tuleb valida tundlikum sugu. Kui selliseid andmeid ei ole, võib kasutada ükskõik kumba sugu.

1.4.3. **Pidamis- ja söötmistingimused**

Temperatuur katseloomade ruumis peab olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavalist laborisööta ja see peab olema vabalt kättesaadav koos piiramatu joogivee varuga. Uuringu ajal ja eelistatavalt ka aklimatiseerumise ajal on loomad metabolismi uurimise üksikpuurides. Kuna sööda ja vee sattumine puuri põrandale võib tulemusi rikkuda, tuleb püüda seda võimalust minimeerida.

1.4.4. **Loomade ettevalmistamine**

Loomad märgistatakse, et iga looma saaks identifitseerida, ja neid hoitakse enne uuringu algust puurides vähemalt viis päeva, et nad harjuksid laboritingimustega.

Pärast aklimatiseerumisperioodi ja umbes 24 tundi enne uuritava aine pealekandmist pügatakse igal loomal nahk õlgade ja selja piirkonnas paljaks. Kahjustatud naha läbilaskvus erineb terve naha omast, seepärast tuleb olla ettevaatlik ja vältida naha marrastamist. Pärast pügamist ja umbes 24 tundi enne uuritava aine kandmist nahale (vt punkti 1.4.7) puhastatakse naha pinda atsetooniga rasu eemaldamiseks. Lisapesu seebi ja veega ei soovitata, kuna seebijäägid võivad soodustada katseaine imendumist. Ala peab olema piisavalt suur, et võimaldada imendunud uuritava kemikaali koguse arvutamist naha cm^2 kohta, eelistatavalt vähemalt 10 cm^2. Selline ala on saavutatav 200–250 g kaaluvatel rottidel. Pärast loomade ettevalmistamist pannakse nad tagasi metabolismi uurimise puuridesse.

1.4.5. **Uuritav aine**

Uuritav aine on aine, mille läbitungimisvõimet uuritakse. Väga hea oleks, kui uuritav aine oleks radioaktiivselt märgistatud.

1.4.6. **Uuritav valmistis**

Uuritava aine valmistis (st puhas aine, lahjendatud aine või segu, mis sisaldab nahale kantavat uuritavat kemikaali) peab olema sama, millega inimesed või võimalikud sihtloomaliigid võivad kokku puutuda (või aimama seda tõetruult järele). Kõiki kõrvalekaldeid tegelikult kasutatavast valmistisest tuleb põhjendada. Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse uuritav aine sobivas kandjas. Muude kandeainete kui vee puhul peavad olema teada imendumisomadused ja võimalik koostoime katseainega.

▼B

1.4.7. **Nahale kandmine**

Nahapinnal määratakse pealekandmise kohana kindlaks konkreetse suurusega ala. Teadaolev uuritava valmistise kogus kantakse seejärel ühtlaselt sellele alale. See kogus peaks reeglina järele aimama võimalikku kokkupuudet inimesel, tavaliselt 1–5 mg/cm^2 tahkete ainete või kuni 10 µl/cm^2 vedelike puhul. Muid koguseid tuleb põhjendada eeldatavate kasutamistingimuste, uuringu eesmärkide või uuritava valmistise füüsikaliste omadustega. Pealekandmise järel tuleb seda kohta kaitsta, et loom ei saaks seda puhastada. Tüüpilise vahendi näide on esitatud joonisel 1. Tavaliselt kaitstakse pealekandmiskohta mittetiheda kattega (nt õhku läbilaskev nailonmarlist kate). Ent piiramatu annuse puhul tuleb pealekandmiskoht katta tiheda kattega. Kui pooleldi lenduva uuritava aine aurumine vähendab katseaine määramissaagist liiga palju (vt ka punkti 1.4.10 esimest lõiku), on aurunud aine vaja kinni püüda pealekandmisvahendi aktiivsöest filtrisse (vt joonis 1). On oluline, et vahend ei kahjustaks nahka, seoks katseainet ega reageeriks sellega. Loomad pannakse tagasi metabolismi uurimise üksikpuuridesse väljaheidete kogumiseks.

1.4.8. **Kokkupuute kestus ja proovide võtmine**

Kokkupuute kestus on ajavahemik uuritava aine pealekandmise ja nahalt pesemise teel eemaldamise vahel. Tuleb kasutada sobivat kokkupuuteaega (tavaliselt 6 või 24 tundi), arvestades inimese kokkupuute eeldatavat kestust. Kokkupuuteaja järel hoitakse loomi metabolismi uurimise puurides kuni planeeritud lõpetamisajani. Loomi tuleb jälgida toksilisuse/ebanormaalsete reaktsioonide suhtes korrapäraste ajavahemike järel kogu uuringu jooksul. Kokkupuuteaja lõpus tuleb nahka vaadelda nähtavate ärritusnähtude suhtes.

Metabolismi uurimise puurid peavad võimaldama uriini ja rooja eraldi kogumist uuringu jooksul. Need peavad võimaldama ka ^{14}C-süsinikdioksiidi ja lenduvate ^{14}C-süsinikühendite kogumist, mida tuleb analüüsida, kui neid tekib suures koguses (> 5 %). Uriin, roe ja kogumisseadmesse jäänud gaasid (nt ^{14}C-süsinikdioksiid ja lenduvad ^{14}C-süsinikühendid) tuleb koguda eraldi igalt rühmalt igal proovide võtmise ajal. Kui on piisavalt teavet selle kohta, et lenduvat radioaktiivset metaboliiti tekib vähe või üldse mitte, võib kasutada avatud puure.

Väljaheiteid kogutakse kokkupuuteperioodi ajal, kuni 24 tundi pärast esmast nahakontakti ja seejärel iga päev kuni katse lõpuni. Kolmest väljaheidete kogumise ajavahemikust tavaliselt piisab, ent valmistise uurimise eesmärke või olemasolevaid kineetikaandmeid arvestades võib valida uuringu jaoks sobivamaid või täiendavaid aegu.

Kokkupuuteperioodi lõpus eemaldatakse igalt loomalt kaitsevahend ja säilitatakse eraldi analüüsimise jaoks. Uuritava valmistisega kokkupuutes olnud nahka pestakse kõikidel loomadel vähemalt 3 korda puhastusvahendiga, kasutades sobivaid tampoone. Tuleb olla ettevaatlik, et mitte saastada teisi kehaosasid. Puhastusaine peab olema tavaline hügieenis kasutatav aine, nt seebi vesilahus. Lõpuks tuleb nahk kuivatada. Kõik tampoonid ja pesuvesi tuleb säilitada analüüsimise jaoks. Seejärel tuleb paigaldada värske kate, et kaitsta kokkupuutes olnud pinda neil loomadel, kes kuuluvad hilisemale ajale vastavatesse rühmadesse, enne kui loomad pannakse tagasi üksikpuuridesse.

▼B

1.4.9. **Katse lõpetamine**

Igas rühmas surmatakse loomad planeeritud ajal ja veri kogutakse analüüsimiseks. Kaitsevahend või kate tuleb analüüsimise jaoks eemaldada. Igalt loomalt eemaldatakse analüüsimiseks kokkupuutekoha nahkja sama suur pügatud nahapind, mis uuritava valmistisega kokku ei puutunud. Kokkupuutekoha naha võib jagada osadeks, eraldades sarvkihi selle all olevast epidermisest, et saada rohkem teavet uuritava kemikaali paiknemise kohta. Uuringud, kuidas kemikaali kogused naha osades muutuvad pärast kokkupuuteperioodi mööduva aja jooksul, peaksid andma ettekujutuse sellest, mis juhtub uuritava kemikaaliga sarvkihis. Naha osadeks jagamise hõlbustamiseks (pärast naha lõplikku pesemist ja looma surmamist) eemaldatakse kaitsekate. Kokkupuutekoha nahk koos rõngakujulise tüki ümbritseva nahaga lõigatakse roti seljast maha ja kinnitatakse alusele. Kleeplindiriba vajutatakse ettevaatlikult naha pinnale ja tõmmatakse siis ära koos osaga sarvkihist. Naha pinnale vajutatakse järjest üha uusi kleeplindiribasid ja tõmmatakse ära; kui kogu sarvkiht on eemaldatud, ei jää riba enam nahapinnale kinni. Iga looma kõik ribad võib panna ühte anumasse, kuhu sarvkihi lahustamiseks lisatakse kudesid lahustavat ainet. Võimalikud sihtkoed võib eemaldada eraldi mõõtmisteks, enne kui ülejäänud korjust analüüsitakse imendunud koguse määramiseks. Üksikloomade korjused säilitatakse analüüsimiseks. Tavaliselt piisab üldsisalduse määramisest. Sihtorganid võib eemaldada eraldi analüüsimiseks (kui see on näidustatud teiste uuringute alusel). Planeeritud surmamise ajal põies leiduv uriin tuleb lisada varem kogutud uriinile. Pärast väljaheidete kogumist metabolismi uurimise puuridest planeeritud surmamise ajal pestakse puurid ja kogumisseadmed sobiva lahustiga. Tuleb uurida ka muud varustust, mis võib olla saastunud uuritava ainega.

1.4.10. **Määramine**

Kõigis uuringutes tuleb püüda täieliku määramissaagise poole (st saagis peaks olema keskmiselt 100 ± 10 % radioaktiivsusest). Kui saagis jääb väljapoole seda vahemikku, siis tuleb seda põhjendada. Igas proovis kasutatud kogust tuleb analüüsida sobivalt valideeritud meetoditega.

Statistiliste arvutustega tuleb määrata iga pealekandmiskatse paralleelkatsete dispersioon.

2. **ANDMED**

Iga looma puhul tuleb igal proovide võtmise ajal teha järgmised uuritava kemikaali ja/või metaboliitide mõõtmised. Lisaks individuaalsetele andmetele tuleb esitada ka proovide võtmise aja alusel rühmitatud andmete keskväärtused.

— kaitsevahenditega seotud kogused;

— nahalt eraldatavad kogused;

— kogused nahas/nahal, mida ei saa nahalt ära pesta;

▼B

— kogus uurimiseks võetud veres;

— kogus väljaheidetes ja väljahingatud õhus (vajadusel);

— kogus, mis jääb korjusesse ja eraldi analüüsimise jaoks eemaldatud organitesse.

Uuritava aine ja/või metaboliitide kogus väljaheidetes, väljahingatud õhus, veres ja korjuses võimaldab määrata igal ajahetkel imendunud aine üldkoguse. Samuti saab arvutada uuritava kemikaali koguse, mis absorbeerus uuritava ainega kokkupuutunud naha 1 cm^2 kohta kokkupuuteperioodi vältel.

3. **TULEMUSTE VORMISTAMINE**

3.1. KATSEPROTOKOLL

Katseprotokollis tuleb esitada katse läbiviimisele seatud nõuded, sealhulgas kasutatud katsesüsteemi põhjendus, ning järgmine teave.

Uuritav aine:

— andmed aine määratlemiseks [nt CASi number, kui see on teada; aine tootja; puhtus (radiokeemiline puhtus); teadaolevad lisandid; partii number];

— füüsikaline iseloomustus, füüsikalis-keemilised omadused (nt pH, lenduvus, lahustuvus, stabiilsus, molekulmass ja log P_{ow}).

Uuritav valmistis:

— koostis ja kasutamise põhjendus;

— üksikasjad uuritava valmistise kohta, pealekantud kogus, saavutatud kontsentratsioon, kandeaine, stabiilsus ja homogeensus.

Katseloom:

— kasutatud liik/aretusliin;

— loomade arv, vanus ja sugu,

— loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

— üksikloomade kaal katse alguses.

Katsetingimused:

— uuritava valmistise manustamise üksikasjad (pealekandmiskoht, määramismeetod, katmine tihedalt või mittetihedalt, maht, ekstraheerimine, määramine);

— toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Tulemused:

— kõik toksilisuse nähud;

— tabel imendumisandmete kohta (väljendatud kiiruse, koguse või protsendina);

▼B

— katse üldised määramissaagised;

— tulemuste tõlgendamine, võrdlus katseaine nahakaudse imendumise seniste andmetega.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829–835.

5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA

6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

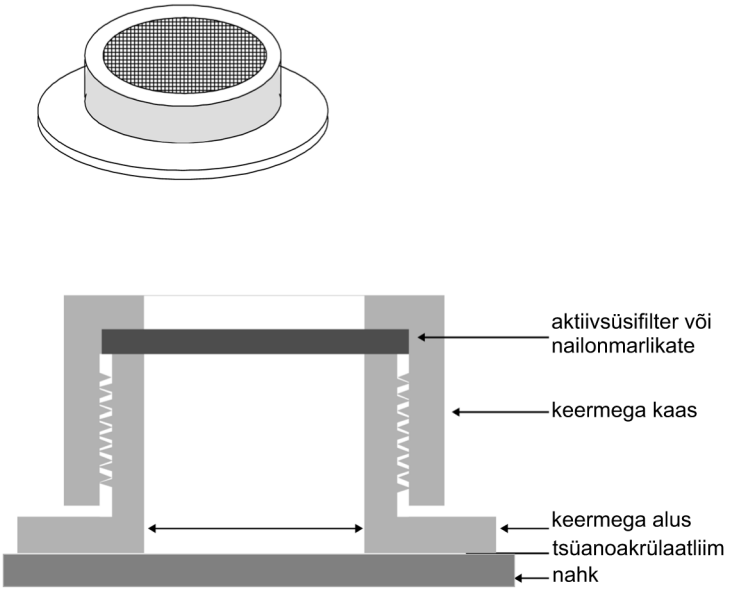
8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399–404.

▼B

Joonis 1

Tüüpiline vahend nahakaudse kokkupuute koha määratlemiseks ja kaitsmiseks *in vivo* nahakaudse imendumise uuringute ajal



▼B

B.45. **NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VITRO* MEETOD**

1. **MEETOD**

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 428 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva meetodiga määratakse väljalõigatud nahatükile kantud uuritava aine imendumist läbi naha. Seda võib kasutada kas koos naha kaudu imendumise *in vivo* meetodiga (1) või iseseisvalt. Sel meetodil põhinevate uuringute kavandamise hõlbustamiseks soovitatakse kasutada OECD juhenddokumenti nahakaudse imendumise uuringute läbiviimiseks (2). Juhenddokument on ette valmistatud, et lihtsustada sobivate *in vitro* protseduuride valimist konkreetsete tingimuste puhul, et tagada selle meetodiga saadud tulemuste usaldusväärsus.

Nahakaudse imendumise ja dermaalse jaotumise mõõtmise meetodid võib jagada kahte kategooriasse: *in vivo* ja *in vitro*. Nahakaudse imendumise *in vivo* meetodeid kasutatakse laialdaselt ja nende abil saadakse farmakoloogilist teavet mitme loomaliigi kohta. *In vivo* meetodit kirjeldatakse eraldi teise katsemeetodi juures (1). Ka *in vitro* meetodeid on juba palju aastaid kasutatud nahakaudse imendumise mõõtmiseks. Kuigi käesoleva katsemeetodiga hõlmatud *in vitro* meetodeid pole ametlikult uuringutega valideeritud, leppisid OECD eksperdid 1999. aastal kokku, et hinnatud andmeid on *in vitro* meetodi toetamiseks piisavalt (3). Täiendavad üksikasjad, mis seda kinnitavad, sealhulgas ka palju *in vitro* ja *in vivo* meetodite otseseid võrdlusi, on esitatud juhenddokumendis (viide 2). Käesolevat teemat on käsitletud mitmes monograafia, milles on üksikasjalikult kirjeldatud *in vitro* meetodi kasutamise tausta (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ja 12). *In vitro* meetoditega mõõdetakse kemikaalide difusiooni nahasse ja läbi naha vedelikureservuaari ning seejuures võib kasutada kas mitteelujõulist nahka ainult difusiooni mõõtmiseks või värsket, metaboolselt aktiivset nahka, et mõõta samaaegselt nii difusiooni kui ka metabolismi nahas. Selliseid meetodeid on kasutatud sõeluuringutes mitmesugustest segudest kemikaalide nahka ja läbi naha imendumise võrdlemisel ning need võivad olla ka kasulikeks mudeliteks läbi naha toimuva imendumise hindamiseks inimesel.

In vitro meetod ei pruugi olla kohaldatav igas olukorras ja kõigi kemikaaliklasside puhul. *In vitro* meetod võib sobida naha läbitavuse esialgseks kvalitatiivseks hindamiseks. Mõnikord on neid andmeid vaja täiendada *in vivo* andmetega. Juhenddokumendis (2) on täpsustatud, millal võib kasutada *in vitro* meetodit. Viites 3 on esitatud täiendav üksikasjalik teave sellekohase otsuse põhjendamiseks.

Käesolevas meetodis esitatakse nahakaudse imendumise ja jaotumise mõõtmise üldpõhimõtted väljalõigatud nahatüki kasutamisel. Võib kasutada paljude imetajaliikide, kaasa arvatud inimese nahka. Naha läbitavusega seotud omadused säilivad pärast kehalt eemaldamist, kuna peamiseks difusioonibarjääriks on eluvõimetu sarvkiht *(stratum corneum);* aktiivset kemikaalide transporti läbi naha ei ole täheldatud. On tõendatud, et nahal on võime metaboli seerida teatud kemikaale nahakaudse imendumise ajal (6); see protsess ei ole küll kiirust limiteeriv tegelikult imendunud kemikaalikoguse seisukohast, kuid võib mõjutada vereringesse sattuva materjali koostist.

▼B

1.2. MÕISTED

Imendumata kogus – kogus, mis pestakse maha naha pinnalt pärast kokkupuudet ja mis leidub difusiooniraku peal asuval kattel, sealhulgas kogus, mille kohta näidatakse, et see lendub nahalt kokkupuute ajal.

Imendunud kogus ***(in vitro)*** – katseaine mass, mis jõuab vastuvõtvasse vedelikku või süsteemsesse ringesse konkreetse ajavahemiku jooksul.

Imendatav kogus ***(in vitro)*** – kogus, mis jääb nahale või naha sisse pärast pesemist.

1.3. KATSEEETODI PÕHIMÕTE

Katseaine, mis võib olla radioaktiivselt märgistatud, kantakse kahte difusiooniraku kambrit eraldava nahatüki pinnale. Kemikaal jääb nahale katseprotokollis näidatud ajaks seal kirjeldatud tingimustes, misjärel see eemaldatakse sobiva puhastamisprotseduuriga. Vastuvõtvast vedelikust võetakse katse käigus proovid teatud ajahetkedel ja analüüsitakse neid uuritava kemikaali ja/või metaboliitide suhtes.

Kui kasutatakse metaboolselt aktiivseid süsteeme, võib sobivate meetoditega analüüsida uuritava kemikaali metaboliite. Katse lõpus mõõdetakse vajadusel uuritava kemikaali ja selle metaboliitide jaotumine.

Sobivates tingimustes, mis on kirjeldatud käesoleva meetodi juhendis ja juhenddokumendis (2), mõõdetakse uuritava aine imendumine teatava ajavahemiku vältel, analüüsides vastuvõtvat vedelikku ja nahka, millele oli kantud kemikaal. Naha sisse jäävat uuritavat ainet tuleb käsitada imendununa, välja arvatud juhtudel, kui saab näidata, et imendumist saab määrata ainult vastuvõtva vedeliku väärtuste abil. Teiste komponentide (nahalt maha pestud ja nahakihtidesse jäänud materjal) analüüsimine võimaldab andmeid täiendavalt hinnata, sealhulgas määrata kogu uuritava aine jaotumise ja saagise protsendi.

Katse läbiviimise korrektsuse ja usaldusväärsuse tõendamiseks viiakse laboris läbi katsed asjaomaste võrdluskemikaalidega; saadud tulemused peavad vastama kasutatud meetodi kohta avaldatud kirjandusandmetele. Selleks võib mõõta sobivat võrdlusainet (mille lipofiilsus võiks olla lähedane uuritava aine omale) samaaegselt uuritava ainega või esitada piisav hulk varasemaid andmeid erineva lipofiilsusega võrdlusainete (nt kofeiin, bensoehape ja testosteroon) imendumise mõõtmise kohta.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Difusioonirakk**

Difusioonirakk koosneb doonorkambrist ja vastuvõtukambrist, mille vahele paigutatakse nahk (tüüpilise kujundusega rakk on kujutatud joonisel 1). Rakuseina ja nahatüki ühenduskoht peab olema tihe, naha alumise pinnaga kontaktis olevast vastuvõtvast lahusest peab saama kergesti proove võtta ja seda lahust peab saama korralikult segada ning raku ja selle sisu temperatuur peab olema hästi kontrollitav. Kasutada võib nii staatilist kui ka läbivooluga difusioonirakku. Tavaliselt jäetakse doonorkamber uuritava aine lõpliku kogusega kokkupuute ajal tihedalt sulgemata. Doonorkambri võib aga pideva pealekandmisega katse ja teatavate lõplike kogustega korraldatavate katsete ajal ka tihedalt sulgeda.

▼B

1.4.2. **Vastuvõttev vedelik**

Eelistatakse füsioloogilisele keskkonnale lähedase vastuvõtva vedeliku kasutamist, kuid kasutada võib ka muid vedelikke, kui see on põhjendatud. Tuleb esitada vastuvõtva vedeliku täpne koostis. Tuleb näidata, et uuritav kemikaal on vastuvõtvas vedelikus piisavalt lahustuv, nii et see vedelik ise ei takistaks imendumist. Lisaks ei tohi vastuvõttev vedelik nahatükki kahjustada. Läbivooluga süsteemi puhul ei tohi voolukiirus takistada uuritava aine difusiooni vastuvõtvasse vedelikku. Staatilise rakuga süsteemis tuleb vedelikku pidevalt segada ja sealt regulaarselt proove võtta. Kui uuritakse metabolismi, peab vastuvõttev vedelik toetama naha elutegevust katse ajal.

1.4.3. **Nahapreparaadid**

Võib kasutada inimeselt või loomalt võetud nahka. Inimese naha kasutamine toimub muidugi vastavalt iga riigi ja rahvusvahelistele eetilistele tõekspidamistele ja tingimustele. Kuigi eelistatakse elusat nahka, võib kasutada ka mitteelusat nahka, kui saab näidata, et see ei ole kahjustatud. Lubatav on kasutada kas epidermaalmembraane (ensümaatiliselt, kuumusega või keemiliselt eraldatud) või dermatoomi abil saadud õhukest nahakihti (paksusega harilikult 200–400 μm). Võib kasutada täispaksusega nahka, kuid liigset paksust *(ca* > 1 mm) tuleb vältida, kui eesmärk ei ole määrata uuritavat kemikaali nahakihtides. Loomaliigi, anatoomilise lokalisatsiooni ja preparatsioonitehnika valik peab olema põhjendatud. Nõutavad on usaldusväärsed andmed vähemalt neljast paralleelproovist uuritava preparaadi kohta.

1.4.4. **Nahapreparaadi kahjustamatus**

On oluline, et nahk oleks õigesti prepareeritud. Vale prepareerimine võib kahjustada *stratum corneum*'i, seepärast tuleb kontrollida, et prepareeritud nahk ei oleks kahjustatud. Kui uuritakse naha metabolismi, tuleb kasutada värskelt lõigatud nahka võimalikult kiiresti pärast lõikamist ja tingimustes, mis teadaolevalt toetavad metaboolset aktiivsust. Üldreeglina tuleb värskelt lõigatud nahka kasutada 24 tunni jooksul, kuid vastuvõetav säilitusperiood võib oleneda metaboliseerivast ensüümsüsteemist ja säilitustemperatuuridest (13). Kui nahapreparaate on enne kasutamist säilitatud, tuleb tõendada, et barjäärfunktsioon on alles.

1.4.5. **Uuritav aine**

Uuritav aine on aine, mille läbitungimisvõimet uuritakse. Väga hea oleks, kui uuritav aine oleks radioaktiivselt märgistatud.

1.4.6. **Uuritav preparaat**

Uuritava aine preparaat (st puhas, lahjendatud või segu koostisse viidud materjal, mis sisaldab nahale kantavat uuritavat ainet) peab olema sama, millega inimene või muu loomaliigi esindaja võib kokku puutuda (või selle lähedane aseaine). Iga kõrvalekaldumine „kasutusel olevast" preparaadist peab olema põhjendatud.

▼B

1.4.7. **Uuritavate ainete kontsentratsioon ja segud**

Tavaliselt kasutatakse mitut uuritava aine kontsentratsiooni, mis on võrreldavad suurima kontsentratsiooniga, millega inimene võib kokku puutuda. Samuti tuleb kaaluda tüüpiliste segude imendumise uurimist.

1.4.8. **Kandmine nahale**

Inimese harilike kokkupuutetingimuste puhul on tavaliselt tegu lõplike kogustega. Seepärast tuleb nahale kanda kogus, mis modelleerib inimese kokkupuudet ainega, ja see on tavaliselt 1–5 mg/cm^2 naha kohta tahkete ainete ja kuni 10 µl/cm^2 vedelike puhul. Kogus peaks olema põhjendatud eeldatavate kasutamistingimuste, uuringu eesmärkide või uuritava preparaadi füüsikaliste omadustega. Näiteks võib naha pinnale kantud koguse lugeda lõpmata suureks, kui uuritavat ainet kantakse pindalaühikule suures mahus.

1.4.9. **Temperatuur**

Temperatuur mõjutab kemikaalide passiivset difusiooni (ja seetõttu nende nahakaudset imendumist). Difusioonikambrit ja nahka tuleb hoida konstantsel temperatuuril, mis on sarnane naha normaalse temperatuuriga 32 ± 1 °C. Erineva kujundusega mõõtmisrakkude puhul on vaja kasutada erinevaid veevanni või soojendatava ploki temperatuure, et tagada vastuvõtva lahuse/naha olek füsioloogilise normi juures. Niiskus peab eelistatavalt olema 30 % ja 70 % vahel.

1.4.10. **Kokkupuute kestus ja proovide võtmine**

Nahk võib uuritava preparaadiga kokku puutuda kogu katse ajal või lühemate ajavahemike jooksul (et modelleerida inimese kokkupuute mõnd konkreetset tüüpi). Liigne uuritava preparaadi kogus pestakse nahalt sobiva puhastusainega ja loputusvesi kogutakse analüüsimiseks. Uuritava preparaadi eemaldamise viis sõltub oodatavatest kasutustingimustest ning peab olema põhjendatud. Tavaliselt on imendumisprofiili piisavaks kirjeldamiseks vaja võtta proove 24 tunni jooksul. Kuna naha kvaliteet võib 24 tunni pärast hakata langema, ei tohi proove tavaliselt võtta kauem kui 24 tunni jooksul. Kiiresti naha sisse tungivate uuritavate ainete puhul ei pruugi pikem mõõtmine olla vajalikki, aeglasemalt naha sisse tungivate ainete puhul võib olla vaja kasutada pikemat aega. Vastuvõtvast vedelikust proovide võtmise sagedus peab olema piisav, et uuritava aine imendumise profiili saaks esitada graafiliselt.

1.4.11. **Katse lõpus tehtavad mõõtmised**

Kõik katsesüsteemi komponendid tuleb analüüsida ja määrata uuritava aine kogused. See hõlmab doonorkambrit, naha pinna loputusvedelikku, nahapreparaati ja vastuvõtva vedeliku kambrit. Mõnel juhul võib eraldi analüüsimise jaoks jagada naha eksponeeritud nahapinnaks ja nahaks, mis paiknes raku ääre all, ning *stratum corneum*'iks, epidermiseks ja dermiseks.

1.4.12. **Analüüsimine**

Kõigis uuringutes tuleb saavutada piisav saagis (eesmärk peaks olema, et keskmine saagis on 100 ± 10 % radioaktiivsusest ja kõrvalekalded sellest peavad olema põhjendatud). Uuritava aine kogused vastuvõtvas vedelikus, naha pesemise vedelikus ja aparaadi loputamise vedelikus tuleb määrata sobiva meetodi abil.

▼B

2. **ANDMED**

Esitatakse vastuvõtva vedeliku analüüs, uuritava kemikaali jaotus katsesüsteemis ja imendumisprofiil sõltuvana ajast. Kui kasutatakse lõplikule kogusele vastavaid kokkupuutetingimusi, tuleb arvutada kogus, mis pesti nahalt ära, nahaga (sh eri nahakihtidega, kui neid analüüsitakse) seotud kogus ja vastuvõtvas vedelikus olev kogus (kiirus ja kogus või protsent pealekantud kogusest). Mõnikord saab nahakaudset imendumist väljendada ainult vastuvõtva vedeliku andmete kasutamisega. Kui katseaine jääb uuringu lõpus naha sisse, võib siiski olla vajalik arvestada ka see kogus imendunud koguse hulka (vt viide 3, punkt 66). Kui kasutatakse lõpmatule kogusele vastavaid kokkupuutetingimusi, võivad andmed võimaldada läbilaskvuskonstandi (Kp) arvutamist. Nende tingimuste puhul pole imendumise protsent oluline.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuandes tuleb esitada katse läbiviimisele seatud nõuded, sealhulgas kasutatud katsesüsteemi põhjendus, ning lisaks järgmine teave.

Uuritav aine:

— füüsikaline iseloomustus, füüsikalis-keemilised omadused (vähemalt molekulmass ja log P_{ow}), puhtus (radiokeemiline puhtus);

— identifitseerimiseks vajalikud andmed (nt partii number);

— lahustuvus vastuvõtvas vedelikus.

Uuritav preparaat:

— koostis ja kasutamise põhjendus;

— homogeensus.

Katse tingimused:

— naha päritolu ja lokalisatsioon, prepareerimise meetod, säilitustingimused enne kasutamist, mis tahes eeltöötlus (puhastamine, antibiootiline töötlus jne), naha kahjustamatuse mõõtmised, metaboolne staatus, kasutamise põhjendus;

— difusiooniraku ehitus, vastuvõtva vedeliku koostis, vastuvõtva vedeliku voolukiirus või proovide võtmise ajad ja meetod;

— uuritava preparaadi pealekandmise üksikasjad ja pealekantud kogus;

— kokkupuute kestus;

— uuritava preparaadi nahalt eemaldamise, nt naha loputamise üksikasjad;

— naha analüüsi üksikasjad ja millist fraktsioneerimistehnikat kasutati, et määrata jaotumine nahas;

▼B

— raku ja varustuse pesemise kord;

— analüüsimeetodid, ekstraheerimistehnika, avastamispiirid ja analüüsimeetodi valideerimine.

Tulemused:

— uuritava aine üldised määratud kogused katses (pealekantud kogus = naha pesuvedelik + nahk + vastuvõttev vedelik + raku pesuvedelik);

— tabel mõõdetud koguste kohta raku igas kambris;

— imendumisprofiil;

— imendumist iseloomustavate andmete tabel (väljendatud kiiruse, koguse või protsendina).

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237–241.

6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications.* CRC Press, Boca Raton.

7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191–205.

9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

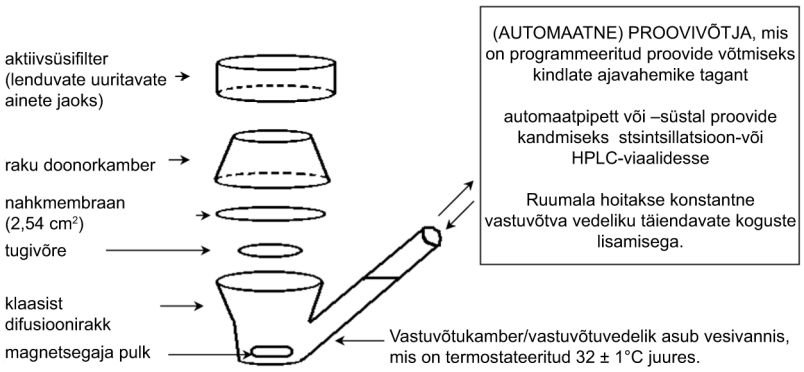
11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356–365.

Joonis 1

Tüüpilise staatilise difusiooniraku ehitus nahakaudse imendumise *in vitro* uuringute puhul



▼M8

B.46. *IN VITRO* NAHAÄRRITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 439 (2015). Nahaärrituse all mõistetakse pöörduva nahakahjustuse tekkimist pärast kuni 4 tunni pikkust uuritava kemikaaliga töötlemist, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1) ning Euroopa Liidu (EL) määruses nr 1272/2008, milles käsitletakse ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (edaspidi „CLP-määrus“) ([1]). Käesoleva katsemeetodi näol on tegemist *in vitro* meetodiga, mida võib kasutada ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 2. kategooriasse kuuluvate ärritavate kemikaalidega (ainete ja segudega) seotud ohu tuvastamiseks (2). Piirkondades, kus ei kasutata ÜRO GHSi kohast vabatahtlikult kohaldatavat 3. kategooriat (nõrgalt ärritavad kemikaalid), võib käesolevat katsemeetodit kasutada ka liigitamata kemikaalide toime kindlakstegemiseks. Sellest tulenevalt võib käesolevat katsemeetodit sõltuvalt kohaldatavast õigusraamistikust ja klassifitseerimissüsteemist kasutada kemikaalide nahka ärritava toime kindlakstegemisel kas eraldi meetodina *in vivo* nahaärrituse hindamise meetodite asendamiseks või katsestrateegia raames kohaldatava osalist asendamist võimaldava meetodina (3).

2. Nahaärrituse hindamisel on tavapäraselt kasutatud laboriloomi (katsemeetod B.4, mis on samaväärne algselt 1981. aastal vastu võetud ning aastatel 1992, 2002 ja 2015 muudetud OECD katsejuhendiga nr 404) (4). Söövitava toime hindamiseks on vastu võetud kolm valideeritud *in vitro* katsemeetodit: ELi katsemeetodid B.40 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 430), B.40b (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 431) ja B.65 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435) (5, 6, 7). OECD juhenddokumendis nahasöövituse ja -ärrituse puhul kasutatava katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (3).

3. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimtervisega seotud lõppnäitajana nahaärritust. Selle meetodi puhul lähtutakse *in vitro* katsesüsteemist, mis põhineb inimese rekonstrueeritud marrasknahal, mis on oma biokeemiliste ja füsioloogiliste omaduste poolest väga sarnane inimese naha pealmiste kihtidega, st marrasknahaga. Inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevas katsesüsteemis kasutatakse rakkude allikana inimese transformeerumata keratinotsüüte, mille abil luuakse representatiivsete histoloogiliste omaduste ja representatiivse rakulise ülesehitusega rekonstrueeritud marrasknaha mudel. Vastavalt OECD juhenddokumendis nr 34 sätestatud põhimõtetele on kehtestatud tulemuslikkuse standardid, mis hõlbustavad inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevate sarnaste ja muudetud katsemeetodite valideerimist ja hindamist (8, 9). Vastavasisuline katsejuhend võeti algselt vastu 2010. aastal ja seda ajakohastati 2013. aastal, et lisada täiendavad inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelid, samuti 2015. aastal, et lisada viide juhenddokumendile katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta ning võimaldada ühe eluvõimelisuse mõõtmiseks sobiva alternatiivse meetodi kasutuselevõttu.

4. Praeguseks on viidud läbi valideerimiseelsed, optimeerimis- ja valideerimisuuringud nelja turul kättesaadava *in vitro* katsemudeliga (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28), mille puhul kasutatakse inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevat katsesüsteemi (tundlikkus 80 %, spetsiifilisus 70 % ja täpsus 75 %). Kõnealust nelja katsemudelit on

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼M8

kirjeldatud käesolevas katsemeetodis ja need on loetletud 2. liites, kus on ühtlasi esitatud teave vastavate meetodite valideerimiseks kasutatud valideerimisuuringute liigi kohta. Nagu on märgitud 2. liites, on käesoleva katsemeetodi ja tulemuslikkuse standardite (8) väljatöötamiseks kasutatud valideeritud standardmeetodit (VSM).

5. OECD otsuse kohane andmete vastastikune tunnustamine on tagatud üksnes selliste katsemudelite puhul, mis on valideeritud vastavuses tulemuslikkuse standarditega (8), ning üksnes juhul, kui OECD on sellised mudelid läbi vaadanud ja vastu võtnud. *In vitro* nahaärrituse hindamise meetoditega saadavaid katsetulemusi käsitlevate siseriiklike nõuete järgimiseks võib kasutada ükskõik millist käesolevasse katsemeetodisse ja vastavasse OECD katsejuhendisse lisatud katsemudelit ning seejuures saadakse kasu andmete vastastikusest tunnustamisest.

6. Käesolevas dokumendis kasutatud mõistete määratlused on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

7. Nagu nähtub inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevate katsemeetodite hindamiseks ja iseloomustamiseks läbi viidud täismahus prospektiivsest valideerimisuuringust (16), on üks käesoleva katsemeetodiga seotud piirangutest see, et meetod ei võimalda liigitada kemikaale vabatahtlikult kohaldatavasse ÜRO GHSi kohasesse 3. kategooriasse (nõrgalt ärritavad kemikaalid) (1). Sellest tulenevalt määratakse käesoleva katsemeetodi kasutusviis kindlaks asjaomases liikmesriigis kohaldatava õigusraamistikuga. ELis ei ole 3. kategooriat CLP-määruses kasutusele võetud. Ühekordse nahakaudse kokkupuute järel nahale avalduva lokaalse toime täielikku hindamist on kirjeldatud OECD juhenddokumendis katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (3). Inimese naha kasutamine toimub mõistagi kooskõlas asjaomases riigis kehtivate ja rahvusvaheliste eetiliste tõekspidamiste ja tingimustega.

8. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimtervisega seotud lõppnäitajana nahaärritust. Ehkki käesolev katsemeetod ei võimalda saada piisavat teavet nahasöövituse kohta, tuleks tähele panna, et nahasöövitust käsitlev katsemeetod B.40b (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 431) põhineb samal inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsesüsteemil, ehkki seal kasutatakse teistsugust katse-eeskirja (6). Käesolev katsemeetod põhineb inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelitel, mille puhul kasutatakse inimese keratinotsüüte ja mis seega kajastavad huvipakkuva liigi sihtelundi omadusi *in vitro*. Peale selle hõlmab see meetod otseselt *in vivo* nahaärrituse puhul täheldatava põletikukaskaadi/toimemehhanismi algetappi (raku- ja koekahjustus, mille tulemusena tekib lokaalne trauma). Käesoleva katsemeetodi valideerimiseks uuriti paljusid eri kemikaale; valideerimisuuringu andmebaasis on kokku 58 kemikaali (16, 18, 23). Meetodit saab kasutada tahkete ainete, vedelike, pooltahkete ainete ja vahade puhul. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Võimaluse korral tuleks tahked ained enne kasutamist peeneks pulbriks jahvatada; proovi muul viisil eeltöötlemine ei ole vajalik. Gaase ja aerosoole ei ole valideerimisuuringu raames veel hinnatud (29). Ehkki on võimalik, et neidki saab uurida inimese rekonstrueeritud marrasknaha kasutamisel põhineva tehnoloogia abil, ei võimalda praegune katsemeetod gaaside ega aerosoolide uurimist.

9. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud. Ent kuna segud kuuluvad paljudesse eri kategooriatesse ja on eri koostisega ning nende kasutamise kohta katses on praegu piiratud hulgal teavet, tuleks juhul, kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria segude puhul kasutada (nt strateegia abil, mille on 2012. aastal välja pakkunud Eskes *et al.* (30)), hoiduda selle kasutamisest sellise

▼**M8**

kategooria segude puhul. Samamoodi tuleks olla ettevaatlik, kui teatud kindlasse klassi kuuluvate või teatavate füüsikalis-keemiliste omadustega kemikaalide puhul täheldatakse, et käesolevat katsemeetodit ei saa nende uurimiseks kohaldada.

10. Uuritavad kemikaalid, mis neelavad valgust samas vahemikus kui MTT formasaan, ning vitaalvärvaine MTT otsest MTT formasaaniks redutseerumist põhjustada võivad uuritavad kemikaalid võivad segada rakkude eluvõimelisuse mõõtmist ja tingida vajaduse kasutada tulemuste korrigeerimiseks kohandatud kontrolle (vt punktid 28–34).

11. Kui uuritava kemikaali liigitamisel saadakse ühene tulemus, piisab ühest mõõtmistsüklist, kus on kasutatud kolme paralleelset koeproovi. Ebaselgete tulemuste puhul – näiteks kui paralleelproovidega saadud mõõtmisandmed lahknevad ja/või keskmine eluvõimelisus on 50 ± 5 % – tuleks kaaluda vajadust viia läbi veel üks mõõtmistsükkel ning esimeses kahes mõõtmistsüklis saadud tulemuste lahknevuse korral veel kolmaski mõõtmistsükkel.

KATSE PÕHIMÕTE

12. Uuritav kemikaal kantakse paikselt kolmemõõtmelisele inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelile, mis koosneb inimese marrasknaha transformeerumata keratinotsüütidest, mida on kasvatatud nii, et need moodustavad inimese mitmekihilise tugevalt diferentseerunud marrasknaha mudeli. See koosneb korrastatud basaalkihist, ogakihist ja sõmerkihist ning mitmekihilisest sarvkihist, mis sisaldab rakkudevahelisi õhukesi lipiidikihte, kus on analoogselt *in vivo* koele esindatud peamiste lipiidiklasside lipiidid.

13. Kemikaali tekitatud nahaärritus, mis avaldub peamiselt punetuse ja tursena, on põhjustatud sellisest sündmuste kaskaadist, mis algab kemikaali läbitungimisega sarvkihist ning sellega kaasneda võiva sarvkihialuste keratinotsüütide ja muude naharakkude kihtide kahjustumisega. Kahjustatud rakkudest võivad vabaneda põletikku vahendavad ained või sellised rakud võivad kutsuda esile põletikureaktsioonide kaskaadi, mis mõjutab ka pärisnaha rakke, eelkõige veresoonte strooma- ja endoteelirakke. Veresoonte laienemine ja endoteelirakkude läbilaskvuse suurenemine põhjustabki nähtava punetuse ja turse (29). Ehkki inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevate katsemeetodite puhul puuduvad *in vitro* katsesüsteemis veresooned, hinnatakse nende meetoditega kõnealust kaskaadi vallandavaid sündmusi, näiteks raku- või koekahjustust (16, 17), mille näitajana kasutatakse rakkude eluvõimelisust.

14. Inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevates mudelites jälgitakse rakkude eluvõimelisuse hindamiseks vitaalvärvaine MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülsinine; CASi number: 298-93-1) ensümaatilist muundumist siniseks formasaansoolaks, mida mõõdetakse kvantitatiivselt pärast kudedest ekstraheerimist (31). Ärritavad kemikaalid tehakse kindlaks nende võime järgi vähendada rakkude eluvõimelisust nii palju, et see jääb allapoole kindlaksmääratud läviväärtust (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase 2. kategooria kemikaalide puhul on see ≤ 50 %). Kemikaalid, mille puhul rakkude eluvõimelisus on kindlaksmääratud läviväärtusest suurem (st > 50 %), võidakse olenevalt asjaomasest õigusraamistikust ja katsemeetodi kohaldatavusest tunnistada mitteärritavaks (kategoriseerimata) kemikaaliks.

▼M8

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

15. Enne käesoleva katsemeetodi kohasest neljast valideeritud katsemudelist (2. liide) ükskõik millise regulaarset kasutamist tuleks labori tehnilise pädevuse tõendamiseks kasutada kümmet tabelis 1 loetletud pädevusainet. Kui näiteks mõni loetletud ainetest ei ole kättesaadav, võib kasutada mõnda muud ainet, mille kohta on olemas piisavad *in vivo* ja *in vitro* võrdlusandmed (nt võrdluskemikaalide loetelust (8) valitud ainet), ent üksnes juhul, kui kohaldatakse samu valikukriteeriume, nagu on kirjeldatud tabelis 1. Pädevuse tõendamiseks mõne muu aine kasutamine peaks olema põhjendatud.

16. Pädevuse tõendamise osana soovitatakse kasutajal pärast kudede saabumist kontrollida nende toimivust kaitsekihina vastavalt inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva asjaomase mudeli tootja kirjeldusele. See on eriti oluline pärast kudede pikaajalist transporti või tarnet pika vahemaa taha. Pärast katsemeetodi edukat kasutuselevõttu ning selle kasutamises pädevuse omandamist ja selle tõendamist ei ole selline tavapärane kontrollimine enam vajalik. Meetodi regulaarse kasutamise korral soovitatakse siiski jätkata kaitsekihina toimivuse hindamist korrapäraste ajavahemike järel.

Tabel 1

Pädevusained ([1])

Aine	CASi nr	*In vivo* hindamistulemus ([2])	Füüsikaline olek	ÜRO GHSi kohane kategooria
KATEGORISEERIMATA AINED (ÜRO GHSi kohastesse kategooriatesse mittekuuluvad ained)				
Naftüüläädikhape	86-87-3	0	Tahkis	Kategoriseerimata
Isopropanool	67-63-0	0,3	Vedelik	Kategoriseerimata
Metüülstearaat	112-61-8	1	Tahkis	Kategoriseerimata
Heptüülbutüraat	5870-93-9	1,7	Vedelik	Kategoriseerimata (*vabatahtlikult kohaldatav 3. kategooria*) ([3])
Heksüülsalitsülaat	6259-76-3	2	Vedelik	Kategoriseerimata (*vabatahtlikult kohaldatav 3. kategooria*) ([3])
KATEGORISEERITUD AINED (ÜRO GHSi kohase 2. kategooria ained)				
3-*p*-kumenüül-2-metüülpropioonaldehüüd	103-95-7	2,3	Vedelik	2. kategooria
1-bromoheksaan	111-25-1	2,7	Vedelik	2. kategooria
Kaaliumhüdroksiid (5 % vesilahus)	1310-58-3	3	Vedelik	2. kategooria
1-metüül-3-fenüül-1-piperasiin	5271-27-2	3,3	Tahkis	2. kategooria
Heptanaal	111-71-7	3,4	Vedelik	2. kategooria

([1]) Need pädevusained on valitud valideerimisuuringus kasutatud ainete hulgast järgmiste kriteeriumide alusel: i) asjaomased kemikaalid on turul kättesaadavad, ii) nendega saadud tulemused hõlmavad kogu Draize'i ärritavusskaalat (mitteärritavatest ainetest tugevalt ärritavate aineteni), iii) nende keemiline struktuur on täpselt teada, iv) need esindavad valideerimisel kasutatud kemikaalide funktsionaalklasse, v) nendega on saadud eri katsetes ja eri laborites reprodutseeritavad *in vitro* tulemused, vi) need on *in vitro* tingimustes õigesti liigitatud ning vii) need ei ole äärmiselt mürgised (nt kantserogeensed või reproduktiivtoksilised) ja nende kõrvaldamise kulud ei ole liiga suured.

([2]) Katsemeetodiga B.4 (4) saadud *in vivo* hindamistulemus.

([3]) Käesoleva katsemeetodi raames käsitatakse ÜRO GHSi kohase vabatahtlikult kohaldatava 3. kategooria kemikaale (nõrgalt ärritavad kemikaalid) (1) kategoriseerimata kemikaalidena.

▼M8

KATSE KÄIK

17. Allpool on esitatud inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva, nahaärrituse hindamiseks kasutatava katsemeetodi elementide ja katse käigu kirjeldus (3. liites on esitatud ka iga katsemudeliga seotud parameetrid). Standardne töökord käesoleva katsemeetodi kohase nelja mudeli rakendamiseks on leitav kirjandusest (32, 33, 34, 35).

INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEVA KATSEMEETODI ELEMENDID

Üldtingimused

18. Epiteelkoe rekonstrueerimiseks tuleks kasutada inimese transformeerumata keratinotsüüte. Talitlusvõimelise sarvkihi all peaks olema mitu kihti eluvõimelisi epiteelirakke (basaalkiht, ogakiht ja sõmerkiht). Sarvkiht peaks olema mitmekihiline ja sisaldama selliseid vajalikke lipiide, et moodustuks funktsionaalne kaitsekiht, mis suudab takistada tsütotoksiliste võrdluskemikaalide, näiteks naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) või Triton X-100 kiiret läbitungimist. Nimetatud kaitsekihina toimimist tuleks tõendada; selle hindamiseks võib teha kindlaks kontsentratsiooni, mille juures võrdluskemikaal vähendab kindlaksmääratud kokkupuuteaja vältel kudede eluvõimelisust 50 % võrra (IC_{50}), või määrata kokkupuuteaja, mille vältel võrdluskemikaal vähendab teatud kindla kontsentratsiooni juures kudede eluvõimelisust 50 % võrra (ET_{50}). Kasutatav inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel peaks olema selline, et aine ei saaks jõuda eluskoeni sarvkihti läbimata, kuna vastasel korral ei ole nahakaudse kokkupuute mudeliga saadud tulemused usaldusväärsed. Kasutatav mudel ei tohiks olla saastunud bakterite, viiruste, mükoplasma ega seentega.

Funktsionaaltingimused

Eluvõimelisus

19. Eluvõimelisuse kvantifitseerimiseks kasutatakse MTT-põhist meetodit (31). Vitaalvärvaine MTT redutseeritakse inimese rekonstrueeritud marrasknaha eluvõimelistes rakkudes siniseks sadestuvaks MTT formasaaniks, mis ekstraheeritakse seejärel koest isopropanooli (või muu sarnase lahusti) abil. Ekstraheerimiseks kasutatava lahusti enda optiline tihedus peaks olema piisavalt väike, st < 0,1. Ekstraheeritud MTT formasaani kvantifitseerimiseks võib kasutada kas tavapärast neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist või HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (36). Inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli kasutajad peaksid tagama, et mudeli iga kasutatav partii vastab negatiivse kontrolli kindlaksmääratud kriteeriumidele. Nahaärrituse hindamiseks kasutatava katsemeetodi kohastes tingimustes saadavate negatiivse kontrolli optilise tiheduse väärtuste lubatud vahemiku (ülem- ja alampiiri) määrab kindlaks asjaomase inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/tarnija. Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud, inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhineva nelja valideeritud katsemudeli puhul lubatud väärtusevahemikud on esitatud tabelis 2. HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutaja peaks negatiivse kontrolli vastuvõetavuse kriteeriumina kasutama tabelis 2 negatiivse kontrolli kohta esitatud optilise tiheduse väärtusevahemikku. Tuleks dokumentaalselt tõendada, et negatiivse kontrolliga töödeldud koed on katses kasutatava kokkupuuteperioodi kestel kultuuris stabiilsed (nende eluvõimelisuse näitajad on sarnased).

Tabel 2

Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud katsemudelite puhul lubatud väärtusevahemikud negatiivse kontrolli optilise tiheduse jaoks

	Vastuvõetavate väärtuste alampiir	Vastuvõetavate väärtuste ülempiir
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Vastuvõetavate väärtuste alampiir	Vastuvõetavate väärtuste ülempiir
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Toimimine kaitsekihina

20. Sarvkiht ja selle lipiidne koostis peavad olema sellised, et takistada tsütotoksiliste võrdluskemikaalide, näiteks SDSi või Triton X-100 kiiret läbitungimist; seda hinnatakse IC_{50} või ET_{50} alusel (tabel 3).

Morfoloogia

21. Tuleks esitada asjaomase inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli histoloogilise analüüsi tulemused, et tõendada inimese marrasknahaga sarnaneva, muu hulgas mitmekihilist sarvkihti sisaldava struktuuri olemasolu.

Reprodutseeritavus

22. Tuleks tõendada katsemeetodiga saadavate positiivseid ja negatiivseid kontrolle iseloomustavate tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul.

Kvaliteedikontroll

23. Asjaomast inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelit tuleks kasutada üksnes juhul, kui selle väljatöötaja/tarnija on tõendanud, et kasutatava mudeli iga partii vastab tootele kehtestatud kvaliteedikriteeriumidele, mille hulgas kõige olulisemad on eluvõimelisuse (punkt 19), kaitsekihina toimivuse (punkt 20) ja morfoloogiaga (punkt 21) seotud kriteeriumid. Sellised andmed tuleks esitada meetodi kasutajatele, et nad saaksid lisada selle teabe katseprotokolli. IC_{50} või ET_{50} väärtuste lubatud vahemiku (ülem- ja alampiiri) peaks kindlaks määrama inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli väljatöötaja/tarnija. Ärritavate kemikaalide liigituse usaldusväärse prognoosimise eesmärgil on vastuvõetavad üksnes sellised tulemused, mis on saadud kvaliteedikontrolli edukalt läbinud kudedega. Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud nelja katsemudeli puhul lubatud väärtusevahemikud on esitatud tabelis 3.

Tabel 3

Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud katsemudeleid käsitlevad partii kvaliteedikontrolli kriteeriumid

	Vastuvõetavate väärtuste alampiir	Vastuvõetavate väärtuste ülempiir
EpiSkin™ (SM) (18-tunnine töötlus SDS-ga) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 tundi	ET_{50} = 8,7 tundi
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 tundi	ET_{50} = 10,0 tundi
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-tunnine töötlus SDS-ga) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Uuritava kemikaali ja kontrollkemikaalidega töötlemine

24. Iga uuritava kemikaali ja kontrolli puhul tuleks igas mõõtmistsüklis kasutada vähemalt kolme paralleelproovi. Nii vedelate kui ka tahkete kemikaalide puhul tuleks töötlemiseks kasutada piisavat kogust uuritavat kemikaali, et marrasknaha pind saaks ühtlaselt kaetud, ent seejuures tuleks hoiduda lõpmata suure annuse kasutamisest; see tähendab, et kemikaali tuleks peale kanda koguses 26–83 µl/cm^2 või mg/cm^2 (vt 3. liide). Tahke kemikaali puhul tuleks marrasknaha pinda enne kemikaali pealekandmist niisutada deioniseeritud või destilleeritud veega, et parandada uuritava kemikaali kontakti marrasknaha pinnaga. Võimaluse korral tuleks tahket kemikaali kasutada peene pulbri kujul. Mõnel juhul võib ühtlasema jaotuse saavutamiseks kasutada nailonvõrku (vt 3. liide). Kokkupuuteperioodi lõppedes tuleks uuritav kemikaal veepõhise puhverlahuse või 0,9 % NaCl lahusega marrasknaha pinnalt hoolikalt maha pesta. Sõltuvalt kasutatavast inimese rekonstrueeritud marrasknaha katsemudelist on kokkupuuteperioodi pikkus 15–60 minutit ja inkubeerimistemperatuur 20–37 °C. Iga konkreetse katsemudeli jaoks tehakse kindlaks optimaalne kokkupuuteperiood ja -temperatuur, mis vastavad asjaomast mudelit iseloomustavatele eriomadustele (näiteks toimivus kaitsekihina) (vt 3. liide).

25. Igas mõõtmistsüklis tuleks kasutada paralleelset negatiivset ja positiivset kontrolli selle tõendamiseks, et kudede eluvõimelisus (negatiivse kontrolli puhul), toimivus kaitsekihina ja sellest sõltuv kudede tundlikkus (positiivse kontrolli puhul) jääb varasemate andmete alusel kindlaks määratud lubatud piiridesse. Soovitatav positiivne kontroll on SDSi 5 % vesilahus. Soovitatav negatiivne kontroll on vesi või fosfaadiga puhverdatud soolalahus (PBS).

Rakkude eluvõimelisuse mõõtmine

26. Vastavalt katse-eeskirjale on väga oluline, et eluvõimelisust mõõdetakse mitte vahetult pärast uuritava kemikaaliga kokku puutumist, vaid pärast töötlemisjärgset piisavalt pikaajalist puhtaks loputatud koe inkubeerimist värskes söötmes. Selline inkubeerimine võimaldab nõrgast tsütotoksilisest toimest taastuda ja selgel tsütotoksilisel toimel esile tulla. Käesoleva katsemeetodi aluseks olevatest inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevatest katsemudelitest kahe puhul leiti meetodi optimeerimise käigus, et optimaalne töötlemisjärgne inkubeerimisperiood on 42 tundi (11, 12, 13, 14, 15).

27. Käesoleva katsemeetodi raames tuleks rakkude eluvõimelisuse mõõtmiseks kasutada kvantitatiivset MTT-põhist standardmeetodit. See sobib kasutamiseks kolmemõõtmelise koestruktuuri puhul. Koeproov asetatakse kolmeks tunniks sobiva kontsentratsiooniga (nt 0,3–1 mg/ml) MTT lahusesse. MTT muundatakse eluvõimelistes rakkudes siniseks formasaaniks. Sadestunud sinine formasaan ekstraheeritakse seejärel lahusti (näiteks isopropanooli või hapestatud isopropanooli) abil ning formasaani kontsentratsiooni määramiseks mõõdetakse lahuse optiline tihedus lainepikkusel 570 nm – seejuures kasutatakse filtrit ribalaiusega kuni ± 30 nm – või rakendatakse HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (vt punkt 34) (36).

28. Uuritava kemikaali optilised omadused või keemiline reageerimine MTTga (näiteks võib kemikaal takistada värvuse teket või põhjustada selle kadu või hoopis selle avaldumist) võivad määramist segada ja põhjustada vigu eluvõimelisuse hindamisel. See võib juhtuda, kui uuritavat kemikaali ei ole loputamise teel koepinnalt täielikult eemaldatud või kui see on tunginud marrasknahka. Kui uuritav kemikaal reageerib otse MTTga (näiteks redutseerib MTTd), on värviline või muutub värviliseks koega kokku puutumisel, tuleks kemikaali põhjustatud, eluvõimelisuse mõõtmist segava mõju tuvastamiseks

▼M8

ja tulemuste korrigeerimiseks kasutada täiendavaid kontrolle (vt punktid 29 ja 33). Üksikasjalik kirjeldus selle kohta, kuidas korrigeerida tulemusi MTT otsese redutseerimise ja värvust muutvate ainete mõju suhtes, on esitatud käesoleva katsemeetodiga hõlmatud nelja valideeritud mudelit käsitlevates standardse töökorra dokumentides (32, 33, 34, 35).

29. MTT otseste redutseerijate tuvastamiseks tuleks lisada iga uuritavat kemikaali värskelt valmistatud MTT lahusesse. Kui MTT lahus värvub uuritava kemikaali toimel siniseks/lillaks, siis käsitatakse asjaomast uuritavat kemikaali MTT otsese redutseerijana ning sel juhul tuleks tavapärasest neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisest või HPLC/UPLC-spektrofotomeetrial põhinevast määramisest sõltumatult kasutada täiendavat funktsionaalset kontrolli inimese rekonstrueeritud marrasknaha eluvõimetute kudedega. Sellise täiendava funktsionaalse kontrolli puhul kasutatakse surmatud kudesid, mille metaboolne aktiivsus on peaaegu kadunud, kuid mis absorbeerivad uuritavat kemikaali eluvõimeliste kudedega sarnasel määral. Iga MTTd redutseeriva uuritava kemikaaliga töödeldakse vähemalt kahte paralleelset surmatud kudede proovi, millega viiakse seejärel läbi täismahus katse, et saada MTT mittespetsiifilist redutseerimist (NSMTT) kajastavad kontrollandmed (32, 33, 34, 35). Olenemata sellest, kui suur on sõltumatult läbi viidavate katsete/-mõõtmistsüklite arv, piisab iga uuritava kemikaali puhul ühest NSMTT-kontrollist. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase MTT redutseerijaga kokkupuutes olnud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse sama MTT redutseerijaga kokkupuutes olnud surmatud kudedega saadud, MTT mittespetsiifilist redutseerimist kajastav protsentuaalse osakaaluna väljendatud väärtus (NSMTT(%)); nimetatud väärtused arvutatakse korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt analüüsitud negatiivset kontrolli iseloomustava väärtuse suhtes.

30. Värviliste uuritavate kemikaalide või vee või isopropanooliga kokku puutumisel värviliseks muutuvate kemikaalide võimaliku segava mõju tuvastamiseks ja täiendavate kontrollide kasutamise vajaduse üle otsustamiseks tuleks teha uuritava kemikaali spektraalanalüüs vees (kokkupuutekeskkond) ja/või isopropanoolis (ekstraheerimislahus). Kui uuritav kemikaal neelab vees ja/või isopropanoolis valgust vahemikus 570 ± 30 nm, tuleks kasutada täiendavaid värvumiskontrolle või teise võimalusena HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat; viimasel juhul ei ole kõnealused kontrollid vajalikud (vt punktid 33 ja 34). Tavapärasel neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisel töödeldakse iga segavat mõju avaldava värvilise uuritava kemikaaliga vähemalt kahte paralleelset eluskoe proovi, millega viiakse seejärel läbi täismahus katse, ent MTTga inkubeerimise etapis kasutatakse MTT lahuse asemel söödet, et saada mittespetsiifilist värvumist (NSC_{elus}) kajastavad kontrollproovid. Eluskudedele iseloomulikust bioloogilisest varieeruvusest tulenevalt tuleb NSC_{elus}-kontrolli kasutada samaaegselt uuritava värvilise kemikaaliga ning mitme katse tegemisel tuleb kasutada igas katses (igas mõõtmistsüklis) eraldi sõltumatut NSC_{elus}-kontrolli. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja MTT lahuses inkubeeritud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse kõnealuse segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja ilma MTT-ta söötmes inkubeeritud eluskudedega saadud, mittespetsiifilist värvumist kajastav protsentuaalse osakaaluna väljendatud väärtus (NSC_{elus} (%)), mille leidmiseks kasutatud kontrollproove on käideldud korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt.

31. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millega saadud tulemustest nähtub nii MTT otsese redutseerimise võime (vt punkt 29) kui ka värvusest tulenev segav mõju (vt punkt 30), on tavapärasel neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisel vaja kasutada eelmistes punktides kirjeldatud NSMTT-kontrolli ja NSC_{elus}-kontrolli kõrval veel kolmandat liiki kontrolli. See on tavaliselt vajalik tumedavärviliste (nt siniste, lillade ja mustade) uuritavate kemikaalide

▼**M8**

puhul, mis avaldavad MTT-põhises katses segavat mõju, kuna takistavad neile omase värvuse tõttu MTT otsese redutseerimise võime hindamist vastavalt punktis 29 kirjeldatule. Sellised uuritavad kemikaalid võivad seonduda nii eluskudede kui ka surmatud kudedega ja seepärast võib juhtuda, et NSMTT-kontrolli abil korrigeeritakse tulemusi mitte üksnes uuritava kemikaali põhjustatud MTT võimaliku otsese redutseerimise suhtes, vaid ka värvusest tuleneva segava mõju suhtes, mis ilmneb uuritava kemikaali seondumisel surmatud kudedega. See võib kaasa tuua kahekordse korrigeerimise, kuna NSC_{elus}-kontrolli abil jubakorrigeeritakse tulemusi värvusest tuleneva segava mõju suhtes, mis ilmneb uuritava kemikaali seondumisel eluskudedega. Et hoida ära võimalikku kahekordset korrigeerimist värvusest tuleneva segava mõju suhtes, tuleb kasutada kolmandat kontrolli, mis võimaldab hinnata surmatud kudede mittespetsiifilist värvumist ($NSC_{surmatud}$). Selle täiendava kontrolli puhul töödeldakse uuritava kemikaaliga vähemalt kahte paralleelset surmatud kudede proovi, millega viiakse seejärel läbi täismahus katse, ent MTTga inkubeerimise etapis kasutatakse MTT lahuse asemel söödet. Olenemata sellest, kui suur on sõltumatult läbi viidavate katsete/-mõõtmistsüklite arv, piisab iga uuritava kemikaali puhul ühest $NSC_{surmatud}$-kontrollist, ent seda tuleks käidelda samaaegselt NSMTT-kontrolliga ja võimaluse korral tuleks kasutada sama partii kudesid. Seejärel arvutatakse kudede tegeliku eluvõimelisuse kindlakstegemiseks asjaomase uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal, millest lahutatakse NSMTT(%) ja NSC_{elus} (%) ning liidetakse kõnealuse segavat mõju avaldava uuritava kemikaaliga kokkupuutes olnud ja ilma MTT-ta söötmes inkubeeritud surmatud kudedega saadud, mittespetsiifilist värvumist kajastav protsentuaalse osakaaluna väljendatud väärtus ($NSC_{surmatud}$ (%)); nimetatud väärtused arvutatakse korrigeeritavate andmete saamiseks kasutatud proovidega paralleelselt analüüsitud negatiivset kontrolli iseloomustava väärtuse suhtes.

32. On oluline silmas pidada, et MTT mittespetsiifilise redutseerimise ja värvusest tuleneva mittespetsiifilise segava mõju tulemusena võivad koeekstraktiga saadud näidud olla suuremad kui spektrofotomeetri lineaarsusvahemikule vastavad väärtused. Sellest lähtuvalt tuleks igas laboris enne regulatiivsel eesmärgil uuritavate kemikaalidega katsete alustamist teha kaubanduslikust allikast pärit MTT formasaani (CASi nr: 57360-69-7) abil kindlaks kasutatava spektrofotomeetri lineaarsusvahemik. Tavapärane neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmine spektrofotomeetriga on MTT otseste redutseerijate ja värvusest tuleneva segava mõjuga uuritavate kemikaalide puhul asjakohane juhul, kui asjaomase uuritava kemikaaliga töödeldud kudede ekstraktide optiline tihedus jääb enne MTT otsese redutseerimise ja/või värvusest tuleneva segava mõju suhtes korrigeerimist spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku või kui uuritava kemikaali puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal on juba enne korrigeerimist ≤ 50 %. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millega saadud NSMTT(%) ja/või NSC_{elus} (%) on negatiivse kontrolliga võrreldуna ≥ 50 %, tuleks siiski suhtuda tulemustesse ettevaatusega, kuna kõnealust väärtust kasutatakse läviväärtusena, mille alusel eristatakse kategoriseeritud kemikaale kategoriseerimata kemikaalidest (vt punkt 36).

33. Tavapäraseks neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmiseks sobimatute värviliste uuritavate kemikaalide puhul, mis avaldavad MTT-põhises katses liiga tugevat segavat mõju, võib MTT formasaani määramiseks kasutada alternatiivina HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat (vt punkt 34) (36). HPLC/UPLC-spektrofotomeetria võimaldab MTT formasaani enne selle kvantifitseerimist uuritavast kemikaalist eraldada (36). Sel põhjusel ei ole NSC_{elus}-kontroll ega $NSC_{surmatud}$-kontroll HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamisel uuritava kemikaali omadustest sõltumata kunagi vajalikud. NSMTT-kontrolli aga tuleks siiski kasutada, kui on põhjust eeldada, et uuritav kemikaal on MTT otsene redutseerija või selle värvus takistab MTT otsese redutseerimise võime hindamist (vastavalt punktis 29 kirjeldatule). Kui MTT formasaani määramiseks kasutatakse HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat, arvutatakse eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul saadud MTT formasaani piigi pindala protsentuaalse osakaaluna paralleelse negatiivse kontrolliga saadud MTT formasaani piigi pindalast. Kemikaalide puhul, mis on võimelised MTT-d otse redutseerima, arvutatakse kudede tegelik eluvõimelisus uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul täheldatud eluvõimeliste kudede protsentuaalse

▼M8

osakaaluna, millest on lahutatud NSMTT(%). Lõpuks tuleks märkida, et selliseid MTT otseseid redutseerijaid, mis võivad avaldada ka värvusest tulenevat segavat mõju ning mis jäävad pärast töötlemist kudedesse ja redutseerivad MTT-d nii tugevalt, et analüüsitavate koeekstraktide puhul täheldatud optiline tihedus (tavapärasel optilise tiheduse mõõtmisel) või piigi pindala (HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamisel) jääb väljapoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku, ei ole võimalik hinnata; seda juhtub eeldatavalt siiski väga harva.

34. HPLC/UPLC-spektrofotomeetriat võib MTT formasaani määramiseks kasutada iga liiki (värviliste, värvitute, MTT-d redutseerivate ja MTT-d mitteredutseerivate) uuritavate kemikaalide puhul (36). Kuna on olemas eri HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteeme, tuleks enne sellise süsteemi kasutamist koeekstraktides sisalduva MTT formasaani määramiseks tõendada asjaomase HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteemi nõuetekohasust; selleks tõendatakse vastavust teatud standardnäitajatega seotud vastuvõetavuskriteeriumidele, mille puhul on lähtutud bioanalüüsimeetodite valideerimist käsitlevates ettevõtjatele ette nähtud USA Toidu- ja Ravimiameti suunistes kirjeldatud kriteeriumidest (36, 37). Kõnealused põhinäitajad ja neile vastavad vastuvõetavuskriteeriumid on esitatud 4. liites. Kui 4. liites määratletud vastuvõetavuskriteeriumid on täidetud, loetakse asjaomane HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteem nõuetekohaseks ja seda võib hakata kasutama MTT formasaani määramiseks käesolevas katsemeetodis kirjeldatud katsetingimustes.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

35. Iga katsemeetodi puhul, kus kasutatakse inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli nõuetekohaseid partiisid (vt punkt 23), peaks negatiivse kontrolliga töödeldud kudesid iseloomustav optiline tihedus kajastama kudede nõutavat kvaliteeti pärast nende tarnimist, vastuvõtmist ja kõikide katse-eeskirja kohaste töötlemistoimingute tegemist. Negatiivse kontrolli puhul täheldatav optiline tihedus ei tohiks olla väiksem kui varasemate andmete põhjal kindlaks määratud alampiir. Samuti peaksid positiivse kontrolliga, st SDSi 5 % vesilahusega töödeldud kudedega saadud tulemused kajastama kudede võimet reageerida ärritavale kemikaalile katsemeetodiga ette nähtud tingimustes (vt 3. liide; täiendav teave on esitatud käesoleva katsemeetodiga hõlmatud nelja katsemudelit käsitlevates standardse töökorra dokumentides (32, 33, 34, 35)). Nimetatud kontrollide puhul kasutatud paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste vahelist varieeruvust iseloomustav sobiv näitaja – st standardhälve – peaks jääma kasutatud katsemudeli puhul kehtestatud vastuvõetavasse vahemikku (vt 3. liide).

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimudel

36. Iga uuritava kemikaaliga saadud optilise tiheduse väärtuste alusel saab arvutada eluvõimeliste kudede protsentuaalse osakaalu negatiivse kontrolli puhul saadud väärtusest, mis on võetud võrdseks 100 protsendiga. HPLC/UPLC-spektrofotomeetria kasutamise korral arvutatakse eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudede puhul saadud MTT formasaani piigi pindala protsentuaalse osakaaluna paralleelse negatiivse kontrolliga saadud MTT formasaani piigi pindalast. Rakkude eluvõimelisuse protsentuaalse osakaalu läviväärtus, mille alusel eristatakse ärritavaid uuritavaid kemikaale kategoriseerimata uuritavatest kemikaalidest, ning tulemuste hindamiseks ja ärritavate kemikaalide tuvastamiseks kasutatav(ad) statistiline/statistilised meetod(id) peaksid olema üheselt kindlaks määratud ja dokumenteeritud ning nende sobivus peaks olema tõendatud (sellekohane teave on esitatud katsemudeleid käsitlevates standardse töökorra dokumentides). Ärritava toime prognoosimiseks kasutatavad läviväärtused on järgmised.

▼M8

— Uuritavat kemikaali käsitatakse ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt kategoriseerimist ja märgistamist vajava (1. või 2. kategooria) kemikaalina, kui eluvõimeliste kudede keskmine protsentuaalne osakaal pärast kemikaaliga kokkupuudet ja töötlemisjärgset inkubeerimist on 50 % või väiksem. Kuna käesoleva meetodiga hõlmatud, inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinevad katsemudelid ei võimalda eristada ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase 1. kategooria kemikaale 2. kategooria kemikaalidest, on uuritava kemikaali lõplikuks kategoriseerimiseks vaja lisateavet kemikaali nahka söövitava toime kohta (vt ka OECD juhenddokument katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (3)). Kui uuritav kemikaal leitakse olevat mittesöövitav (näiteks lähtuvalt katsemeetodist B.40, B.40b või B.65) ning sellega kokku puutunud kudede eluvõimelisus pärast töötlemisjärgset inkubeerimist on 50 % või väiksem, käsitatakse seda ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 2. kategooriasse kuuluva nahka ärritava kemikaalina.

— Uuritav kemikaal, millega kokku puutunud kudede eluvõimelisus pärast töötlemisjärgset inkubeerimist on suurem kui 50 %, võidakse olenevalt asjaomase liikmesriigi õigusraamistikust tunnistada nahka mitte ärritavaks, ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt kategoriseerimata kemikaaliks.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

37. Iga mõõtmistsükli puhul tuleks esitada tabeli kujul andmed iga paralleelse koeproovi kohta (näiteks optilise tiheduse väärtused ja eluvõimeliste rakkude protsentuaalne osakaal iga uuritava kemikaali puhul koos liigitamise tulemusega), sealhulgas vajaduse korral korduskatsete tulemused. Peale selle tuleks esitada igas mõõtmistsüklis saadud tulemuste keskväärtused koos standardhälbega. Iga asjaomase uuritava kemikaali puhul tuleks esitada andmed seoses täheldatud mõjuga MTT-le või värvilise uuritava kemikaali segava mõjuga.

Katseprotokoll

38. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollkemikaalid:

— ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— allikas ja partii number, kui see on olemas;

— vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollkemikaali töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);

— uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;

— säilitustingimused.

Kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel ja katse-eeskiri (ning vajaduse korral nende valimise põhjendus)

▼**M8**

Katsetingimused:

— kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudel (sealhulgas partii number);

— mõõteseadme (nt spektrofotomeetri) kaliibrimisandmed, MTT formasaani kvantifitseerimiseks kasutatud lainepikkus ja filtri ribalaius (vajaduse korral) ning mõõteseadme lineaarsusvahemik; MTT formasaani kvantifitseerimiseks kasutatud meetodi kirjeldus;

— vajaduse korral HPLC/UPLC-spektrofotomeetriasüsteemi nõuetekohasuse tõendamise kirjeldus; kogu täiendav teave konkreetse kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeli, sealhulgas selle kasutamise tulemuslikkuse kohta. See hõlmab vähemalt järgmisi aspekte:

  i) eluvõimelisus;

  ii) toimimine kaitsekihina;

  iii) morfoloogia;

  iv) reprodutseeritavus ja ennustusjõud;

  v) mudeli kvaliteedi kontroll;

— viide varasematele andmetele mudeli kohta. See hõlmab vähemalt kvaliteedikontrolli andmete vastuvõetavust lähtuvalt varasematest andmetest partii kohta;

— pädevusainetega katsete tegemine eesmärgiga tõendada katsemeetodi kasutamise pädevust enne meetodi regulaarset rakendamist.

Katse käik:

— kasutatud katse-eeskirja üksikasjalik kirjeldus (sealhulgas teave kokkupuuteperioodi järgsete pesemisetappide kohta);

— kasutatud uuritava kemikaali ja kontrollkemikaalide annused;

— kokkupuuteperioodi ja kokkupuutejärgse inkubeerimisperioodi kestus ja temperatuur; MTT otseste redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollid;

— iga uuritava kemikaali ja iga kontrolli (positiivse ja negatiivse kontrolli ning vajaduse korral NSMTT-kontrolli, NSC_{elus}-kontrolli ja/või $NSC_{surmatud}$-kontrolli) puhul kasutatud paralleelsete koeproovide arv;

— kasutatud otsustuskriteeriumide/prognoosimudeli kirjeldus lähtuvalt kasutatud inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudelist;

— kõikide katsemeetodis tehtud (sealhulgas pesemisetappidega seotud) muudatuste kirjeldus.

Mõõtmistsüklis või katses saadavate tulemuste vastuvõetavuse kriteeriumid:

— varasemate andmete kohased positiivse ja negatiivse kontrolli puhul saadud keskväärtused ja vastuvõetavate väärtuste vahemikud; positiivse ja negatiivse kontrolli puhul paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvuse vastuvõetav määr;

▼**M8**

— uuritava kemikaali puhul paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvuse vastuvõetav määr.

Tulemused:

— tabeli kujul mõõtmisandmed iga uuritava kemikaali kohta iga mõõtmistsükli ja iga paralleelproovi puhul, sealhulgas optilise tiheduse või MTT formasaani piigi pindala väärtused, eluvõimeliste kudede protsentuaalne osakaal ja selle näitaja keskväärtus koos standardhälbega;

— vajaduse korral MTT otseste redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollidega saadud tulemused, sealhulgas optilise tiheduse või MTT formasaani piigi pindala väärtused, NSMTT(%), NSC_{elus} (%) ja/või $NSC_{surmatud}$ (%), standardhälbed ning eluvõimeliste kudede lõplik korrigeeritud protsentuaalne osakaal;

— uuritava(te) kemikaali(de) ja kontrollidega saadud tulemuste vastavus mõõtmistsüklis või katses saadavate tulemuste vastuvõetavuse kindlaksmääratud kriteeriumidele;

— muu täheldatud toime kirjeldus;

— klassifitseerimistulemused lähtuvalt kasutatud prognoosimudelist/otsustuskriteeriumidest.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Viies, täiendatud väljaanne. ÜRO, New York ja Genf. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Euroopa Keskus (ECVAM) (2009). Statement on the Performance Under UN GHS of Three *In-Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC31), 9. aprill 2009. Kättesaadav aadressil https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf.

(3) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(4) Käesoleva lisa peatükk B.4 „Äge nahaärritus/-söövitus“.

(5) Käesoleva lisa peatükk B.40 „*In vitro* nahasöövitus: transkutaanse elektritakistuse (TET) mõõtmisel põhinev katsemeetod“.

(6) Käesoleva lisa peatükk B.40b „*In vitro* nahasöövitus: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.

(7) Käesoleva lisa peatükk B.65 „*In vitro* membraanibarjääri katsemeetod nahasöövituse uurimiseks“.

▼**M8**

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation Testing as described in TG 439. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 220. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(10) Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M., ja Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. In Vitro* 15: 57–93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C., ja Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study. *Toxicol. In Vitro* 16: 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B., ja Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests. *ALTEX* 21: 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D., ja Spielmann, H. (2005). The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test. *ATLA* 33: 351–367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R., ja Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process. *ATLA* 33: 329–349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M., Wiemann, C., ja Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation. The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force Report 2. *ATLA* 30: 109–129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I., ja Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. *ATLA* 35: 559–601.

(17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I., ja Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. *ATLA* 35: 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E., ja Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy – Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients. *ALTEX* 14: 351–358.

▼**M8**

(20) ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC26), 27. aprill 2007. Kättesaadav aadressil https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf.

(21) ECVAM (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *NB! Tegemist on algsete tulemuslikkuse standarditega, mida on kasutatud kahe katsemeetodi valideerimiseks. Neid tulemuslikkuse standardeid ei tohiks enam kasutada, kuna nüüd on kättesaadav nende ajakohastatud versioon (8).*

(22) ECVAM (2008). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC29), 5. november 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf.

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 137. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T., ja Hata, K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol. *J. Toxicol. Sci.* 34: 327–334.

(25) Katoh, M., ja Hata, K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439. *AATEX* 16: 111–122.

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 159. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 155. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y., ja Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24. *Altern. Lab. Anim*. 40: 33–50.

(29) Welss, T., Basketter, D. A., ja Schröder, K. R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models. *Toxicol. In Vitro* 18: 231–243.

(30) Eskes, C., *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62: 393–403.

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55–63.

▼**M8**

(32) Standardne töökord mudeli EpiSkin™ jaoks (veebruar 2009). Versioon 1.8. ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min – 42 hours for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals.

(33) Standardne töökord mudeli EpiDerm™ jaoks (muudetud märtsis 2009). Versioon 7.0. Katse-eeskiri „*In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT). For Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm™ (EPI 200-SIT)".

(34) Standardne töökord mudeli SkinEthic™ RHE jaoks (veebruar 2009). Versioon 2.0. SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (juuni 2011). Standardne töökord mudeli EPI-MODEL24 SIT jaoks. Versioon 8.3. Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model „LabCyte EPI-MODEL24".

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., ja McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Pooleliolev käsikiri.

(37) USA Toidu- ja Ravimiamet (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. USA tervishoiu- ja sotsiaalteenuste ministeerium, Toidu- ja Ravimiamet (mai 2001). Kättesaadav aadressil [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J. D., Lamminstausta, K., ja Maibach, H. I. (1995). Irritant Contact Dermatitis. Väljaandes: Practical Contact Dermatitis. Guin, J. D. (toim.), McGraw-Hill, New York. Lk 7–18.

(39) ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *NB! Tegemist on ECVAMi tulemuslikkuse standardite praeguse versiooniga, mida ajakohastati 2009. aastal seoses ÜRO GHSi rakendamisega. Neid tulemuslikkuse standardeid ei tohiks enam kasutada, kuna nüüd on kättesaadav nende ajakohastatud versioon (8), mis on seotud käesoleva katsemeetodiga.*

(40) ECVAM (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis. Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC31), 8. juuli 2009.

(41) Euroopa Komisjon (2001). Komisjoni 6. augusti 2001. aasta direktiiv 2001/59/EÜ, millega kahekümne kaheksandat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta. *Euroopa Ühenduste Teataja* L 225, lk 1–333.

▼M8

1. liide

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Asendav meetod – katsemeetod, mis on kavandatud tavakasutuses oleva, ohu tuvastamiseks ja/või riski hindamiseks heaks kiidetud meetodi asendamiseks ning mille puhul on kindlaks tehtud, et sellega tagatakse iga võimaliku määramisolukorra ja kemikaali puhul vastavalt vajadusele inimeste või loomade tervise või keskkonna samaväärne või parem kaitse kui heakskiidetud meetodiga (9).

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (9).

ET_{50} – näitaja, mille hinnangulise väärtuse leidmiseks tehakse kindlaks kokkupuuteperiood, mille jooksul rakkude eluvõimelisus väheneb teatava kindlaksmääratud kontsentratsiooniga võrdluskemikaaliga töötlemise tagajärjel 50 % võrra; vt ka mõistet IC_{50}.

GHS (ÜRO ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavituselemente nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (1).

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

IC_{50} – näitaja, mille hinnangulise väärtuse leidmiseks tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures võrdluskemikaal vähendab teatava kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kudede eluvõimelisust 50 % võrra; vt ka mõistet ET_{50}.

In vivo *nahaärritus* – pöörduva nahakahjustuse tekkimine uuritava kemikaali kuni neljaks tunniks pealekandmise tagajärjel. Nahaärritus on mõjutatud nahakoe kohalik reaktsioon, mis tekib lühikese aja jooksul pärast kokkupuudet (38). Seda põhjustab kohalik põletikureaktsioon, milles osaleb nahakoe kaasasündinud (mittespetsiifilise) immuunsuse süsteem. Selle peamine iseloomulik tunnus on pöörduv kulg, mis hõlmab põletikureaktsiooni ja enamikku põletikuga seotud iseloomulikest kliinilistest ärritusnähtudest (punetus, turse, sügelus ja valu).

Kemikaal – aine või segu.

Lõpmata suur annus – marrasknahale kantud uuritava kemikaali kogus, mis on suurem kui marrasknaha pinna täielikuks ja ühtlaseks katmiseks vajalik kogus.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokkusegamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MTT – 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülsinise tetrasooliumbromiid.

▼M8

Mõõtmistsükkel – ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine negatiivse ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

NSC_{elus} – eluskudede mittespetsiifiline värvumine.

$NSC_{surmatud}$ – surmatud kudede mittespetsiifiline värvumine.

NSMTT – MTT mittespetsiifiline redutseerumine.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud kemikaaliga, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Rakkude eluvõimelisus – näitaja, mis väljendab rakupopulatsiooni summaarset aktiivsust, näiteks raku mitokondri dehüdrogenaaside võimet redutseerida vitaalvärvainet MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid; tiasolüülsinine), ning mis olenevalt mõõdetavast lõppnäitajast ja kasutatavast katseplaanist korreleerub elusrakkude üldarvu ja/või elujõulisusega.

Segu – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (9).

Tulemuslikkuse standardid – valideeritud katsemeetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse mehhanismilt ja tööpõhimõttelt sarnase kavandatud katsemeetodi võrreldavust. Need hõlmavad: i) katsemeetodi olulisi elemente, ii) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja iii) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel (9).

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (9).

Täpsus – katsemeetodiga saadud tulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (9).

UPLC – ülikõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

▼**M8**

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (9).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Vastavus – tulemuslikkuse näitaja katsemudeli puhul, millega saadakse kategoriseeritav tulemus; üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse mõnikord täpsuse tähenduses ja see on määratletud kui õigesti positiivseks või negatiivseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide uuritud kemikaalide seas. Vastavus sõltub väga suurel määral positiivsete tulemuste osakaalust uuritavale kemikaalile vastavat liiki kemikaalide hulgas (9).

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

▼**M8**

2. liide

KÄESOLEVA KATSEMEETODIGA HÕLMATUD KATSEMUDELID

Nr	Katsemudeli nimetus	Valideerimisuuringu liik	Allikaviited
1	EpiSkin™	Täismahus prospektiivne valideerimisuuring (2003–2007). Selle katsemudeli elemente kasutati katsemeetodi oluliste elementide määratlemiseks ECVAMi algsetes ja ajakohastatud tulemuslikkuse standardites (39, 40, 21) (*). Peale selle kasutati kõnealuse meetodiga saadud andmeid, mis on seotud kategoriseerimata ainete eristamisega kategoriseeritud ainetest, peamise lähtealusena spetsiifilisuse ja tundlikkuse määrade kehtestamiseks algsetes tulemuslikkuse standardites (*).	2, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 32, 39, 40
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*algversioon*): algselt viidi selle katsemudeliga aastatel 2003–2007 läbi täismahus prospektiivne valideerimisuuring, mis hõlmas ka mudelit nr 1. Selle katsemudeli elemente kasutati katsemeetodi oluliste elementide määratlemiseks ECVAMi algsetes ja ajakohastatud tulemuslikkuse standardites (39, 40, 21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** algversioonis mudeli EpiDerm™ muudetud versioon valideeriti ECVAMi algsete tulemuslikkuse standardite (21) alusel 2008. aastal (*).	2, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 33, 39, 40,2, 21, 22, 23, 33
3	SkinEthic™ RHE	ECVAMi algsetel tulemuslikkuse standarditel (21) põhinev 2008. aastal tehtud valideerimisuuring (*).	2, 21, 22, 23, 31
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Valideerimisuuring (2011–2012), mille puhul lähtuti OECD katsejuhendiga nr 439 seotud tulemuslikkuse standarditest (8), mis põhinevad ECVAMi ajakohastatud tulemuslikkuse standarditel (*) (39, 40).	24, 25, 26, 27, 28, 35, 39, 40 ning käesoleva katsemeetodi kohased tulemuslikkuse standardid (8) (*)

(*) ECVAMi algsed tulemuslikkuse standardid (21) töötati välja 2007. aastal pärast seda, kui oli viidud lõpule prospektiivne valideerimisuuring (16), milles hinnati katsemudelite nr 1 ja 2 tulemuslikkust seoses ohtlikke aineid käsitlevas kahekümne kaheksandat korda muudetud ELi direktiivis (41) kirjeldatud klassifitseerimissüsteemiga. Aastal 2008 hakati kohaldama ÜRO GHSi (1) ja ELi CLP-määrust, millega suurendati *in vivo* läviväärtust, mille alusel eristatakse kategoriseerimata aineid kategoriseeritud ainetest, väärtuselt 2,0 väärtuseni 2,3. Selle muutunud regulatiivse nõude järgimiseks ajakohastati 2009. aastal ECVAMi tulemuslikkuse standardites sätestatud täpsuse väärtusi ja võrdluskemikaalide loetelu (2, 39, 40). Sarnaselt algsetele tulemuslikkuse standarditele lähtuti ka ajakohastatud tulemuslikkuse standardite puhul peamiselt mudelitega nr 1 ja 2 saadud andmetest (16), ent peale selle kasutati ka mudeliga nr 3 saadud andmeid võrdluskemikaalide kohta. Aastal 2010 kasutati kõnealuseid ECVAMi ajakohastatud tulemuslikkuse standardeid käesoleva katsemeetodi kohaste tulemuslikkuse standardite sätestamiseks (8). Käesoleva katsemeetodi puhul käsitatakse VSMina meetodit EpiSkin™, kuna seda kasutati kõikide tulemuslikkuse standardites sätestatud kriteeriumide väljatöötamiseks. Üksikasjalik teave valideerimisuuringute kohta, kogutud andmed koondatud kujul ja taustteave tulemuslikkuse standardites tehtud vajalike kohanduste kohta seoses ÜRO GHSi / CLP-määruse rakendamisega on esitatud asjaomast OECD katsejuhendit nr 439 käsitlevas ECVAMi / Saksamaa Föderaalse Riskihindamise Instituudi (BfR) selgitavas taustdokumendis (23).

SIT – nahaärrituskatse.

RHE – inimese rekonstrueeritud marrasknahk.

▼**M8**

3. liide

KATSE-EESKIRJA KOHASED SPETSIIFILISED PARAMEETRID KÄESOLEVA KATSEMEETODIGA HÕLMATUD IGA KATSEMUDELI KOHTA

Asjaomaseid inimese rekonstrueeritud marrasknaha mudeleid käsitlevad katse-eeskirjad on väga sarnased; tuleb märkida, et neist kõikide puhul on töötlemisjärgse inkubatsiooniperioodi kestus 42 tundi (32, 33, 34, 35). Erinevused on seotud eelkõige järgmise kolme parameetriga, mis kajastavad katsemudelite erisusi kaitsekihina toimimisel: A) eelinkubeerimise aeg ja söötme kogus, B) uuritava kemikaaliga töötlemine ning C) söötme kogus töötlemisjärgsel inkubeerimisel.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic™ RHE	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Eelinkubeerimine				
Inkubeerimisaeg	18–24 tundi	18–24 tundi	< 2 tundi	15–30 tundi
Söötme kogus	2 ml	0,9 ml	0,3 või 1 ml	0,5 ml
B) Uuritava kemikaaliga töötlemine				
Vedelike puhul	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Tahkete ainete puhul	10 mg (26 mg/cm^2) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DV (25 µl)
Nailonvõrgu kasutamine	Ei kasutata	Vajaduse korral	Kasutatakse	Ei kasutata
Kokkupuuteperioodi kestus	15 minutit	60 minutit	42 minutit	15 minutit
Kokkupuutetemperatuur	Toatemperatuur	a) 25 minutit toatemperatuuril b) 35 minutit 37°C juures	Toatemperatuur	Toatemperatuur
C) Söötme kogus töötlemisjärgsel inkubeerimisel				
Söötme kogus	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Suurim lubatav varieeruvus				
Paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste standardhälve (SD)	SD≤18	SD≤18	SD≤18	SD≤18

DV: destilleeritud vesi.
DPBS: fosfaadiga puhverdatud Dulbecco soolalahus.

▼**M8**

4. liide

HPLC/UPLC-SPEKTROFOTOMEETRIASÜSTEEMI NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID JA PÕHINÄITAJAD INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAST EKSTRAHEERITUD MTT FORMASAANI MÄÄRAMISE VÕIMALDAMISEKS

Näitaja	USA Toidu- ja Ravimiameti suunistel põhinev katse-eeskiri (36, 37)	Nõuetekohasuse kriteeriumid
Selektiivsus	Isopropanooli, eluskudede tühiproovi (isopropanooliekstrakt inimese rekombineeritud marrasknaha eluskudedest, mida ei ole ühelgi viisil töödeldud) ja surmatud kudede tühiproovi (isopropanooliekstrakt inimese rekombineeritud marrasknaha surmatud kudedest, mida ei ole ühelgi viisil töödeldud) analüüsimine	Segavale signaalile vastav pindala on ≤ 20 % LLOQ-le ([1]) vastavast pindalast
Kordustäpsus	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused (st MTT formasaan kontsentratsioonis 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanoolis (n = 5)	Variatsioonikordaja on LLOQ puhul ≤ 15 % või ≤ 20 %
Mõõtetäpsus	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 5)	Hälve on ≤ 15 % või LLOQ puhul ≤ 20 %
Maatriksiefekt	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskudede tühiproovis (n = 5)	85 % ≤ maatriksiefekt ≤ 115 %
Ülekandumine	Isopropanooli analüüsimine pärast ULOQ ([2]) puhul kasutatavat standardit	Segavale signaalile vastav pindala on ≤ 20 % LLOQ-le vastavast pindalast
Reprodutseeritavus (samal päeval)	3 sõltumatut kaliibrimiskõverat, mis põhinevad MTT formasaani kuuel järjestikusel 1: 3 lahjendusel isopropanoolis alates ULOQ-st, st kontsentratsioonist 200 µg/ml; kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 5)	Kaliibrimiskõverad: hälve on ≤ 15 % või LLOQ puhul ≤ 20 % Kvaliteedikontrolli proovid: hälve on ≤ 15 % ja variatsioonikordaja ≤ 15 %
Reprodutseeritavus (eri päevade lõikes)	1. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 3) 2. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 3) 3. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedikontrolli kemikaali lahused isopropanoolis (n = 3)	
MTT formasaani lühiajaline püsivus inimese rekonstrueeritud marrasknaha koeekstraktis	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskudede tühiproovis (n = 3); analüüsitakse valmistamise päeval ja pärast 24-tunnist toatemperatuuril säilitamist	Hälve on ≤ 15 %
MTT formasaani pikaajaline püsivus inimese rekonstrueeritud marrasknaha koeekstraktis (vajaduse korral)	Kvaliteedikontrolli kemikaali lahused eluskudede tühiproovis (n = 3); analüüsitakse valmistamise päeval ja pärast mitmepäevast säilitamist kindlaksmääratud temperatuuril (nt 4°C, –20°C, –80°C)	Hälve on ≤ 15 %

([1]) LLOQ – alumine määramispiir, mis määratluse kohaselt vastab kudede eluvõimelisuse määrale 1–2 %; st 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ – ülemine määramispiir, millele vastav kontsentratsioon on määratluse kohaselt vähemalt kaks korda suurem kui MTT formasaani suurim eeldatav kontsentratsioon negatiivsetest kontrollproovidest saadud isopropanooliekstraktides; st 200 µg/ml.

▼M7

B.47. VEISE SARVKESTA HÄGUSUSE JA LÄBILASKVUSE KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEOSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 437 (2013). Veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*, BCOP) katsemeetodit hinnati alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) poolt koostöös alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskuse (ECVAM) ja alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskusega (JaCVAM) 2006. ja 2010. aastal (1, 2). Esimesel hindamisel hinnati BCOP-katsemeetodi kasulikkust selliste kemikaalide (ainete ja segude) kindlakstegemisel, mis tekitavad rasket silmakahjustust (1). Teisel hindamisel hinnati BCOP-katsemeetodi kasulikkust selliste kemikaalide (ainete ja segude) kindlakstegemisel, mida ei klassifitseerita seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (2). BCOP-katsemeetodi valideerimise andmebaas sisaldas 113 ainet ja 100 segu (2, 3). Nendest hindamistest ja eksperdiarvamustest tehti järeldus, et kõnealuse katsemeetodiga on võimalik õigesti kindlaks teha kemikaale (nii aineid kui ka segusid), mis tekitavad rasket silmakahjustust (1. kategooria), ja ka kemikaale, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega, nagu need on määratletud Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (4) ja määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP) ([1]); sellepärast on kõnealune meetod tunnistatud teaduslikult põhjendatuks mõlemaks eesmärgiks. Raske silmakahjustus on koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemise langus pärast uuritava kemikaali silma eespinnale manustamist, kui kahjustus ei ole 21 päeva jooksul pärast uuritava kemikaali manustamist täielikult taandunud. Uuritav kemikaal, mis põhjustab rasket silmakahjustust, klassifitseeritakse vastavalt ÜRO GHSile 1. kategooriasse. Kemikaal, mida ei klassifitseerita seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega, on määratletud kui kemikaal, mis ei vasta ÜRO GHSi 1. või 2. (2A või 2B) kategooriasse klassifitseerimise nõuetele, see tähendab, et sellele viidatakse kui ÜRO GHSi kategooriata kemikaalile. Käesolevas katsemeetodis on esitatud BCOP-katse soovitatav kasutusala ja piirangud, mis põhinevad hindamistel. Peamised erinevused OECD katsejuhendi 2009. aasta originaalversiooni ja ajakohastatud 2013. aasta versiooniga on järgmised, kuid ei piirdu nendega: BCOP-katsemeetodit kasutatakse selliste kemikaalide tuvastamiseks, mis ei vaja klassifitseerimist vastavalt ÜRO GHSile (punktid 2 ja 7); selgitatud on BCOP-katsemeetodi kohaldatavust alkoholide, ketoonide ja tahkete kemikaalide (punktid 6 ja 7) ning ainete ja segude (punkt 8) uurimiseks; selgitatud on pindaktiivsete ainete või selliseid aineid sisaldavate segude uurimist (punkt 28); selgitatud ja ajakohastatud on positiivse kontrolli küsimusi (punktid 39 ja 40); ajakohastatud on BCOP-katsemeetodi alusel otsuse tegemise kriteeriume (punkt 47); ajakohastatud on katse nõuetekohasuse kriteeriume (punkt 48); ajakohastatud on katseprotokollis esitatavaid andmeelemente (punkt 49); ajakohastatud on 1. liidet mõistete kohta; lisatud on 2. liide BCOP-katsemeetodi prognoosivõime kohta eri klassifitseerimissüsteemide kasutamisel; ajakohastatud on 3. liites esitatud pädevuse tõendamise kemikaalide loetelu; ning ajakohastatud on 4. liidet BCOP-katses kasutatava sarvkestahoidiku (punkt 1) ja hägususmõõtja kohta (punktid 2 ja 3).

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼M7

Praegu ollakse üldiselt arvamusel, et lähitulevikus ei ole võimalik ärritava toime kogu ulatuse prognoosimisel eri kemikaaliklasside puhul ühegi *in vitro* silmaärrituse katsega asendada Draize'i *in vivo* silmakatset. Kuid mitme alternatiivse testi strateegilise (astmelise) kombineerimisega võib siiski olla võimalik asendada Draize'i silmakatset (5). Ülalt-alla lähenemisviisi (5) tuleks kasutada siis, kui olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et kemikaal võib silma tugevasti ärritada; alt-üles lähenemisviisi (5) tuleks kasutada siis, kui olemasoleva teabe põhjal ei eeldata, et kemikaal põhjustab piisavat silma ärritust, mis nõuaks klassifitseerimist. BCOP-meetod on *in vitro* katsemeetod, mida võib kasutada teatavatel asjaoludel ja teatavate konkreetsete piirangutega, et klassifitseerida ja märgistada silmade jaoks ohtlike kemikaale. Seda ei peeta katsemeetodiks, mis üksinda võiks asendada küüliku *in vivo* silma katset, kuid BCOP-katsemeetodit soovitatakse kasutada lähtepunktina ülalt-alla katsetamisstrateegias, mida soovitasid Scott jt (5) sellise kemikaali kindlakstegemiseks, mis tekitab rasket silmakahjustust, st mis tuleb ÜRO ühtse ülemaailmse süsteemi kohaselt klassifitseerida 1. kategooriasse ilma edasiste uuringuteta (4). BCOP-meetodit soovitatakse kasutada ka selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis ei vaja klassifitseerimist seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses süsteemis (ÜRO GHSi kategooriata kemikaal) (4) katsestrateegias, milles kasutatakse alt-üles lähenemisviisi (5). Kemikaal, mille puhul BCOP-katsega ei prognoosita raske silmakahjustuse tekitamist või kuulumist silmaärrituse või raske silmakahjustuse seisukohast klassifitseerimist vajavaks kemikaaliks, vajab siiski täiendavat (*in vitro* ja/või *in vivo*) uurimist, mille alusel saaks määrata lõpliku klassifikatsiooni.

Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada protseduure, millega hinnatakse uuritava kemikaali võimalikku ohtlikkust silmale selle võime kaudu põhjustada veiselt isoleeritud sarvkesta hägustumist või suurenenud läbilaskvust. Toksilist toimet sarvkestale mõõdetakse: i) valgusläbilaskvuse vähenemise (hägususe tekke) ja ii) naatriumfluorestseiini läbilaskvuse suurenemise järgi. Sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse hinnangud, mis on tehtud pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava kemikaaliga, kombineeritakse, et saada *in vitro* ärritava toime punktisumma (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS), mida kasutatakse kemikaali ärritava toime taseme hindamiseks.

Mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

Käesolev katsemeetod põhineb ICCVAMi BCOP-katsemeetodi eeskirjal (6, 7), mis töötati algselt välja teabe alusel, mis saadi *In Vitro* Teaduste Instituudi (IIVS) ja INVITTOXi metoodikatest124 (8). Viimast kasutati Euroopa Ühenduse rahastatud eelvalideerimisuuringus aastatel 1997–1998. Mõlemad eeskirjad põhinevad BCOP-katse metoodikal, mille esimesena avaldasid Gautheron ja kaasautorid (9).

BCOP-katsemeetodit saab kasutada selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis tekitavad rasket silmakahjustust, nagu on määratletud ÜRO GHSis, ja mis tuleb klassifitseerida ÜRO GHSi 1. kategooriasse (4). Kui BCOP-katsemeetodit kasutatakse sellel eesmärgil, on katse kogutäpsus 79 % (150/191), valepositiivsete tulemuste määr on 25 % (32/126) ja valenegatiivsete tulemuste määr 14 % (9/65), võrreldes küüliku silma *in vivo* katsemeetodi andmetega, mis on klassifitseeritud ÜRO GHSi klassifitseerimise süsteemi järgi (3) (vt 2. liide, tabel 1). Kui andmebaasist jäetakse välja teatavad uuritavate kemikaalide klassid (st alkoholid, ketoonid) või füüsikalised klassid (st tahked kemikaalid), on katse kogutäpsus 85 % (111/131), valepositiivsete tulemuste määr on 20 % (16/81) ja valenegatiivsete tulemuste määr 8 % (4/50) ÜRO GHSi klassifikatsiooni süsteemi

▼M7

korral (3). BCOP-katsemeetodi võimalikud puudused rasket silmakahjustust põhjustavate (st ÜRO GHSi 1. kategooria) kemikaalide kindlakstegemisel on seotud valideerimise andmebaasis täheldatud rohkete valepositiivsete tulemustega alkoholide ja ketoonide määramisel ning rohkete valenegatiivsete tulemustega tahkete kemikaalide määramisel (1–3). Kuna BCOP-katsemeetodiga ei määratud siiski mitte kõiki alkohole ja ketoone asjatult positiivseks ja mõned neist määrati õigesti ÜRO GHSi 1. kategooriasse, ei peeta neid kahte orgaaniliste kemikaalide funktsionaalset rühma olevaks väljaspool kõnealuse katsemeetodi kasutusala. Katsemeetodi kasutaja peab ise otsustama, kas ta võib lubada mõne alkoholi või ketooni liigset määramist positiivseks või tuleks tõendite kaalukuse lähenemisviisi alusel teha edasisi katseid. Valenegatiivsete tulemuste kohta tahkete kemikaalide puhul tuleks märkida, et tahke kemikaal võib põhjustada erinevaid ja äärmuslikke kokkupuutetingimusi Draize'i *in vivo* silmaärrituskatses, mis võib segada tegeliku ärritava toime õigesti hindamist (10). Samuti tuleks märkida, et ükski valenegatiivne kemikaal ICCVAMi valideerimise andmebaasis (2, 3) ei andnud rasket silmakahjustust põhjustavate kemikaalide (ÜRO GHSi 1. kategooria) kindlakstegemisel tulemuseks väärtust IVIS $\leq$ 3; see on kriteerium, mille alusel tuleks kemikaal määrata ÜRO GHSi kategooriata kemikaaliks. Peale selle, BCOP-katse valenegatiivsed tulemused ei ole kriitilise tähtsusega, kuna kõiki uuritavaid kemikaale, mille puhul 3 < IVIS $\geq$ 55, uuritakse hiljem muude asjakohaselt valideeritud *in vitro* testidega või viimase võimalusena, sõltuvalt regulatiivsetest nõuetest, katsetes küülikutega, kasutades järjestikuste katsete tegemise strateegiat ja tõendite kaalukuse lähenemisviisi. Võttes arvesse asjaolu, et mõned tahked kemikaalid on BCOP-katsemeetodiga õigesti määratud ÜRO GHSi 1. kategooriasse, ei ole ka see füüsikaline olek väljaspool kõnealuse meetodi kasutusala. Teadlased võiksid kaaluda kõnealuse meetodi kasutamist iga tüüpi kemikaalide puhul, kusjuures IVIS > 55 tuleks lugeda tõendiks, et kemikaal põhjustab rasket silmakahjustust ja tuleks liigitada ÜRO GHSi 1. kategooriasse ilma edasise katsete tegemiseta. Nagu juba märgitud, tuleb alkoholide või ketoonidega saadud positiivsetesse tulemustesse suhtuda ettevaatusega, kuna nende puhul on oht toimet üle hinnata.

BCOP-katsemeetodit saab kasutada ka selleks, et teha kindlaks kemikaale, mida ÜRO GHSi järgi ei ole vaja klassifitseerida silmade ärrituse või raske silmakahjustuse tekitajatena (4). Kui BCOP-katsemeetodit kasutatakse sellel eesmärgil, on katse kogutäpsus 69 % (135/196), valepositiivsete tulemuste määr on 69 % (61/89) ja valenegatiivsete tulemuste määr 0 % (0/107), võrreldes küüliku silma *in vivo* katsemeetodi andmetaga ÜRO GHSis klassifitseerimise süsteemi järgi (3) (vt 2. liide, tabel 2). Saadud valepositiivsete tulemuste määr (ÜRO GHSi kategooriata kemikaalide puhul, mille IVIS > 3, vt punkt 47) on küllaltki suur, kuid kõnealuses kontekstis mitte kriitiline, kuna kõiki uuritavaid kemikaale, mille puhul 3 < IVIS $\leq$ 55, uuritakse hiljem muude asjakohaselt valideeritud *in vitro* testidega või viimase võimalusena, sõltuvalt regulatiivsetest nõuetest, katsetes küülikutega, kasutades järjestikuste katsete tegemise strateegiat ja tõendite kaalukuse lähenemisviisi. BCOP-katsemeetodil ei ole spetsiifilisi vajakajäämisi alkoholide, ketoonide ja tahkete ainete uurimisel, kui eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis ei vaja klassifitseerimist seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi kategooriata kemikaal) (3). Teadlased võiksid kaaluda kõnealuse meetodi kasutamist iga tüüpi kemikaalide puhul, kusjuures negatiivne tulemus (IVIS $\leq$ 3) tuleks lugeda tõendiks, et kemikaal ei vaja klassifitseerimist (ÜRO GHSi kategooriata kemikaal). Kuna BCOP-katsemeetodiga saab õigesti määrata vaid 31 % kemikaalidest, mis ei vaja klassifitseerimist silmi ärritava või rasket silmakahjustust tekitavana, ei tohiks seda meetodit kasutada esimese valikuna nn alt-üles lähenemisviisi (5) puhul, kui on olemas muid valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* meetodeid, millel on sarnane suur tundlikkus, aga suurem spetsiifilisus.

▼M7

BCOP-katsemeetodi valideerimise andmebaas sisaldas 113 ainet ja 100 segu (2, 3). BCOP-katsemeetodit peetakse seepärast kohaldatavaks nii ainete kui ka segude uurimiseks.

BCOP-katsemeetodit ei soovitata kasutada sellise uuritava kemikaali kindlakstegemiseks, mis tuleks klassifitseerida silmi ärritavaks (ÜRO GHSi 2. või 2A kategooria) või silmi nõrgalt ärritavaks (ÜRO GHSi 2B kategooria), kuna sellega on palju ÜRO GHSi 1. kategooria kemikaale klassifitseeritud liiga madalasse kategooriasse, nagu ÜRO GHSi 2., 2A või 2B kategooria; samuti on ÜRO GHSi kategooriata kemikaale klassifitseeritud liiga kõrgesse kategooriasse, nagu ÜRO GHSi 2., 2A või 2B kategooria (2, 3). Selleks võib vaja minna täiendavaid uuringuid muu sobiva meetodiga.

Veiste silmade ja sarvkestadega tehtavate kõigi toimingute puhul tuleb järgida katselaboris kohaldatavaid loomsete materjalide, kaasa arvatud (kuid mitte ainult) kudede ja koevedelike käsitsemise eeskirju ja korda. Soovitatakse järgida üldisi laboratoorseid ohutusnõudeid (11).

BCOP-katsemeetodiga ei uurita sidekesta ega vikerkesta vigastusi; sellega uuritakse toimet sarvkestale, mis on põhiline alus *in vivo* klassifitseerimisel, kui kaalutakse klassifitseerimist vastavalt ÜRO GHSile. Iseenesest ei saa BCOP-katsemeetodiga hinnata sarvkestakahjustuste pöörduvust. Küüliku silma uuringute põhjal on tehtud ettepanek, et sarvkestavigastuse algsügavuse hindamist võib kasutada pöördumatu toime mõne tüübi kindlaks tegemiseks (12). Siiski on vaja rohkem teaduslikult põhjendatud teadmisi, et mõista, kuidas tekib pöördumatu mõju, mis ei ole seotud esialgse raske vigastusega. Lõpuks ei võimalda BCOP-katsemeetod hinnata silma kokkupuutega kaasneva süsteemse toksilisuse võimalikkust.

Kõnealust meetodit ajakohastatakse korrapäraselt uue teabe ja andmete põhjal. Näiteks võib olla kasulik histopatoloogiline uuring, kui sarvkesta kahjustust on vaja täielikumalt kirjeldada. Nagu on selgitatud OECD juhenddokumendis nr 160 (13), innustatakse meetodi kasutajaid sarvkesti säilitama ja valmistama histopatoloogilisi preparaate, mida saab kasutada andmebaasi ja otsustamiskriteeriumide väljatöötamiseks, mille abil võib selle meetodi täpsust veelgi parandada.

Igal laboril, kes alustab käesoleva katsemeetodi kasutamist, tuleks oma pädevuse kontrollimiseks kasutada 3. liites esitatud pädevuse kontrolli kemikaale. Labor võib osutatud kemikaale kasutada selleks, et tõendada oma tehnilist pädevust BCOP-katse läbiviimisel, enne kui ta esitab BCOP-katsemeetodiga saadud andmed regulatiivseks ohu klassifitseerimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

BCOP-katsemeetod on organotüüpne mudel, mille abil on lühiajaliselt võimalik säilitada veise sarvkesta normaalset füsioloogilist ja biokeemilist talitlust *in vitro*. Katsemeetodis hinnatakse uuritava kemikaali põhjustatud kahjustust sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse muutuste mõõtmisega hägususmõõtja ja nähtava valguse spektrofotomeetri abil. Mõlema suuruse alusel arvutatakse IVIS, mille alusel uuritavale kemikaalile määratakse *in vitro* ärritava toime klassifikatsiooni kategooria, et prognoosida uuritava kemikaali silmi ärritava toime potentsiaali *in vivo* (vt otsustuskriteeriumid, punkt 48).

BCOP-katsemeetodi puhul kasutatakse värskelt tapetud veise silmast eraldatud sarvkesta. Sarvkesta hägusust mõõdetakse kvantitatiivselt sarvkesta läbinud valgushulga alusel. Läbilaskvust mõõdetakse kvantitatiivselt värvaine naatriumfluorestseiini kogusena, mis on läbinud kogu sarvkesta paksuse ja jõudnud tagumises kambris olevasse söötmesse. Uuritavad kemikaalid kantakse sarvkesta

▼M7

epiteliaalsele pinnale sel teel, et need lisatakse sarvkestahoidiku eesmisesse kambrisse. 4. liites on esitatud BCOP-katsemeetodi sarvkestahoidiku kirjeldus ja skeem. Sarvkestahoidikuid võib osta mitmelt firmalt või ehitada ise.

Veisesilmade hankimine, loomade vanus ja valimine

Tapamajja saadetavad veised tapetakse harilikult kas inimtoiduks või muul kaubanduslikul eesmärgil. BCOP-katseks sobib üksnes sarvkest, mis on võetud tervelt loomalt, keda peetakse sobivaks inimtoidus kasutamiseks. Kuna veised on tõust, vanusest ja soost olenevalt väga erineva kaaluga, ei ole looma soovitatavat kaalu tapmise ajal määratletud.

Eri vanuses loomade silmade kasutamise korral võivad sarvkesta mõõtmed olla erinevad. Sarvkestad, mille horisontaalläbimõõt on üle 30,5 mm ja paksus keskosas vähemalt 1 100 μm, on tavaliselt pärit üle kaheksa aasta vanustelt veistelt, samas kui sarvkestad horisontaalläbimõõduga alla 28,5 mm ja paksusega keskosas alla 900 μm on tavaliselt veistelt, kelle vanus on alla viie aasta (14). Seepärast ei kasutata tavaliselt üle 60 kuu vanuste veiste silmi. Alla 12 kuu vanuste veiste silmi ei ole tavaliselt kasutatud, sest nende silmad alles arenevad ning sarvkesta paksus ja läbimõõt on oluliselt väiksemad kui täiskasvanud veistel. Noorloomade (vanus 6–12 kuud) sarvkestade kasutamine on siiski lubatav, sest on ka teatavaid eeliseid, nagu suurem kättesaadavus, kitsas vanusevahemik ja väiksem oht, et töötajad võivad kokku puutuda veiste spongiformse entsefalopaatiaga (15). Kuna oleks kasulik hinnata söövitavate või ärritavate kemikaalide suhtes avalduva sarvkesta tundlikkuse sõltuvust sarvkesta suurusest või paksusest, palutakse kasutajatel teatada, mis vanuses ja/või millise kaaluga loomadelt pärinesid uuringus kasutatud sarvkestad.

Silmade eemaldamine ja transport laborisse

Silmad eemaldatakse tapamaja töötajate poolt. Selleks et viia miinimumini silmade mehaanilised ja muud tüüpi vigastused, tuleb silmad eemaldada võimalikult kiiresti pärast looma surma, jahutada kohe pärast eemaldamist ning hoida jahutatult transpordi ajal. Et vältida silmade kokkupuudet ärritust põhjustada võivate kemikaalidega, ei tohi tapamaja töötajad looma pea loputamisel kasutada detergente.

Silmad tuleks paigutada sobiva suurusega anumasse nii, et need oleksid üleni kaetud Hanki tasakaalustatud soolalahusega (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS), ja transportida laborisse nii, et nende kahjustumise või bakteriaalse saastumise oht oleks minimaalne. Kuna silmad võetakse tapmisprotsessi ajal, võivad need kokku puutuda vere ja muude bioloogiliste materjalidega, sealhulgas bakterite ja muude mikroorganismidega. Seepärast on oluline tagada, et silmade saastumise risk viidaks miinimumini (näiteks silmi sisaldava anuma hoidmisega jääl silmade võtmise ja transportimise ajal ning antibiootikumide lisamisega HBSS-le, milles silmi säilitatakse transportimise ajal [näiteks penitsilliin kontsentratsioonis 100 IU/ml ja streptomütsiin kontsentratsioonis 100 μg/ml]).

Ajavahemik silmade eemaldamise ja sarvkestade BCOP-katses kasutamise vahel peaks olema võimalikult lühike (tavaliselt eemaldatakse ja kasutatakse samal päeval), kusjuures tuleks tõendada, et see ei mõjuta katsetulemusi. Nende tulemuste aluseks on silmade valimise kriteeriumid ning positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud tulemused. Kõik katses kasutatud silmad peavad olema ühest ja samast silmade rühmast, mis on võetud ühel konkreetsel päeval.

Silmade valimise kriteeriumid BCOP-katsemeetodi puhul

Silmi uuritakse pärast laborisse saabumist hoolikalt, et neil ei esineks defekte, sealhulgas suurenenud hägusust, kriimustusi ega neovaskularisatsiooni. Kasutatakse ainult sellistest silmadest pärit sarvkesti, milles selliseid defekte ei ole.

▼M7

Iga sarvkesta kvaliteeti hinnatakse ka katse hilisematel etappidel. Sarvkestad, mille hägusus on suurem kui seitse hägususe ühikut või selle ekvivalenti katses kasutatud hägususmõõtja ja sarvkestahoidikute puhul pärast esialgset ühe tunni pikkust tasakaalustumisperioodi, visatakse ära (*MÄRKUS:* hägususmõõtja tuleks kaliibrida hägususe standardiga, mida kasutatakse hägususe ühikute kindlaks tegemiseks, vt 4. liide).

Igas katserühmas (uuritav kemikaal, sellega paralleelselt läbiviidavad positiivse ja negatiivse kontrolli katsed) kasutatakse vähemalt kolme silma. BCOP-katsemeetodi puhul kasutatakse negatiivse kontrolli katses kolme sarvkesta. Kuna kõik sarvkestad eemaldatakse kogu silmamunalt ja paigutatakse sarvkestakambrisse, võivad üksiku sarvkesta, sealhulgas negatiivse kontrolli katses kasutatud sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse väärtusi mõjutada käsitsemisest tekkinud artefaktid. Lisaks kasutatakse negatiivse kontrolliga töödeldud sarvkestadega saadud väärtusi, et korrigeerida uuritava kemikaali ja positiivse kontrolliga töödeldud sarvkestade hägususe ja läbilaskvuse väärtusi IVIS-tulemuste arvutustes.

KATSE KÄIK

Silmade ettevalmistamine

Defektitud sarvkestad eemaldatakse koos 2–3 mm laiuse kõvakestaäärega, mis hõlbustab edasist käsitsemist, kusjuures tuleb vältida sarvkesta epiteeli ja endoteeli kahjustamist. Eraldatud sarvkestad kinnitatakse spetsiaalsesse sarvkestahoidikusse, millel on eesmine kamber – selle poole on sarvkesta epiteliaalne külg –, ja tagumine kamber, mille poole on endoteliaalne külg. Mõlemad kambrid täidetakse kuni ülevoolamiseni eelsoojendatud EMEM-söötmega (*Eagle's Minimum Essential Medium*), mis ei sisalda fenoolpunast, alustades tagumisest kambrist ja jälgides, et ei tekiks mulle. Seadet tasakaalustatakse seejärel temperatuuril 32 ± 1 °C vähemalt üks tund, et sarvkestad tasakaalustuksid söötmega ja saavutaksid võimalikus ulatuses normaalse metaboolse aktiivsuse (sarvkesta pinna ligikaudne temperatuur *in vivo* on 32 °C).

Pärast tasakaalustumisperioodi lisatakse mõlemasse kambrisse värsket eelsoojendatud EMEMi, mis ei sisalda fenoolpunast, ja registreeritakse iga sarvkesta hägususe lähteväärtus. Katsest jäetakse välja kõik sarvkestad, millel esineb makroskoopilisi koekahjustusi (näiteks kriimustusi, pigmentatsiooni, neovaskularisatsiooni) või mille hägusus on suurem kui seitse hägususe ühikut või selle ekvivalenti katses kasutatud hägususmõõtja ja sarvkestahoidikute puhul. Negatiivse (või lahusti) kontrolli rühma valitakse vähemalt kolm sarvkesta. Ülejäänud sarvkestad jagatakse seejärel kahte rühma: uuritava kemikaali töödeldavad ja positiivse kontrolli katse sarvkestad.

Kuna vee soojusmahtuvus on suurem kui õhul, on inkubeerimise ajal võimalik veega saavutada püsivamaid temperatuuritingimusi. Seepärast soovitatakse sarvkestahoidikute ja nende sisu säilitamiseks temperatuuril 32 ± 1 °C kasutada vesivanni. Kuid kasutada võib ka õhktermostaate, võttes vajalikud meetmed temperatuuri stabiilsuse säilitamiseks (näiteks sarvkestahoidikute ja söötmete eelsoojendamine).

Uuritava kemikaaliga töötlemine

Kasutatakse kaht töötlemismeetodit, millest üks on vedelike ja (tahkete või vedelate) pindaktiivsete ainete jaoks ning teine on selliste tahkete kemikaalide jaoks, mis ei ole pindaktiivsed.

Vedelikke katsetatakse ilma lahjendamata. Pooltahkeid kemikaale, kreeme ja vahasid uuritakse tavaliselt nagu vedelikke. Puhtaid pindaktiivseid aineid katsetatakse kontsentratsioonis 10 % (w/v) 0,9 % naatriumkloriidi lahuses, destilleeritud vees või muus lahustis, mille kohta on tõendatud, et sel ei ole kahjulikku toimet katsesüsteemile. Muude lahjenduskontsentratsioonide kasutamist tuleb asjakohaselt põhjendada. Pindaktiivseid aineid sisaldavaid segusid võib katsetada kas lahjendamata või sobiva kontsentratsioonini lahjendatult, olenevalt vastavast

▼M7

kokkupuutestsenaariumist *in vivo*. Muu uuritud lahjenduskontsentratsiooni kasutamist tuleb asjakohaselt põhjendada. Sarvkestadel lastakse vedelike ja pindaktiivsete ainetega kokku puutuda 10 minutit. Muu kokkupuuteaja kasutamise korral tuleb esitada piisav teaduslik põhjendus. Pindaktiivse aine ja sellist ainet sisaldava segu mõisted on esitatud 1. liites.

Tahkeid kemikaale, mis ei ole pindaktiivsed, katsetatakse lahuste või suspensioonidena kontsentratsioonis 20 % (w/v) 0,9 % naatriumkloriidi lahuses, destilleeritud vees või muus lahustis, mille kohta on tõendatud, et sel ei ole kahjulikku toimet katsesüsteemile. Teatavatel puhkudel ja asjakohase teadusliku põhjendusega võib tahkeid kemikaale katsetada ka puhtal kujul, kui uuritav kemikaal kantakse otse sarvkesta pinnale, kasutades lahtise kambri meetodit (vt punkt 32). Sarvkestad jäetakse tahke kemikaaliga kokkupuutesse neljaks tunniks, kuid nagu ka vedelike ja pindaktiivsete ainete puhul võib asjakohase teadusliku põhjendusega kasutada ka muid kokkupuuteaegu.

Pealekandmiseks võib kasutada mitmesuguseid meetodeid, olenevalt uuritava kemikaali füüsikalisest olekust ja keemilistest omadustest (näiteks tahke kemikaal, vedelik, viskoosne või mitteviskoosne vedelik). Oluline on tagada, et uuritav kemikaal kataks korralikult epiteliaalse pinna ja eemaldataks täielikult loputamistega. Mitteviskoosse või väheviskoosse uuritava vedela kemikaali puhul kasutatakse tavaliselt suletud kambri meetodit, samas kui poolviskoosse ja viskoosse vedela uuritava kemikaali või tahke puhta kemikaali uurimiseks kasutatakse tavaliselt lahtise kambri meetodit.

Suletud kambri meetodis viiakse eesmisesse kambrisse kambri ülaosas asuvate annustamisavade kaudu piisav kogus uuritavat kemikaali (750 µl), et see kataks sarvkesta epiteliaalse külje; seejärel suletakse avad kokkupuute ajaks korgiga. Oluline on tagada, et iga sarvkest oleks uuritava kemikaaliga kokkupuutes vajaliku ajavahemiku jooksul.

Lahtise kambri meetodis võetakse eesmise kambri akna kinnitusrõngas ja klaasaken enne pealekandmist ära. Kontrolli kemikaal või uuritav kemikaal (750 µl või sarvkesta täielikuks katmiseks piisav kogus) kantakse mikropipetiga otse sarvkesta epiteliaalsele pinnale. Kui uuritavat kemikaali on raske pipeteerida, võib kemikaali doseerimise hõlbustamiseks viia rõhu all kolbpipetti. Kolbpipeti otsik sisestatakse süstla dosaatorotsikusse, nii et materjali saab rõhu all viia kolbpipeti otsikusse. Samaaegselt pipetikolvi tagasitõmbamisega lastakse süstla kolb vabaks. Kui pipetiotsikusse ilmuvad õhumullid, surutakse uuritav kemikaal välja ja võtet korratakse, kuni otsik on täidetud ja selles ei ole õhumulle. Vajaduse korral võib kasutada tavalist (ilma nõelata) süstalt, kuna sellega saab uuritava kemikaali ruumala täpselt mõõta, samuti on sellega võimalik kemikaali hõlpsamini kanda sarvkesta epiteliaalsele pinnale. Pärast uuritava kemikaali pealekandmist pannakse eesmise kambri klaasaken tagasi, et taas tekiks suletud süsteem.

Kokkupuutejärgne inkubeerimine

Pärast kokkupuuteaja lõppu eemaldatakse uuritav kemikaal, negatiivne kontroll või positiivse kontrolli kemikaal eesmisest kambrist ja epiteeli pestakse vähemalt kolm korda (või nii kaua, kuni kemikaali jääke ei ole enam võimalik näha) EMEMiga (millesse on lisatud fenoolpunast). Loputamiseks kasutatakse fenoolpunast sisaldavat lahust, kuna fenoolpunase värvuse muutust võib kasutada happelise või aluselise uuritava kemikaali väljapesemise täielikkuse hindamiseks. Sarvkesti pestakse rohkem kui kolm korda, kui fenoolpunane muudab veel oma värvi (kollane või punakaslilla) või kuni uuritavat kemikaali on veel näha. Kui

▼M7

söötmes ei ole enam uuritavat kemikaali, loputatakse sarvkesti viimast korda (fenoolpunast mittesisaldava) EMEMiga. Fenoolpunast mittesisaldavat EMEMi kasutatakse viimaseks loputuseks, et tagada fenoolpunase eemaldamine eesmisest kambrist enne hägususe mõõtmist. Seejärel täidetakse eesmine kamber värske (fenoolpunast mittesisaldava) EMEMiga.

Vedelike ja pindaktiivsete kemikaalide puhul inkubeeritakse sarvkesti pärast loputamist veel kaks tundi temperatuuril 32 ± 1 °C. Mõnes olukorras on pikem kokkupuutejärgne ajavahemik kasulik ja seda tuleks juhupõhiselt kaaluda. Tahke kemikaaliga töödeldud sarvkesti loputatakse põhjalikult pärast neljatunnilist kokkupuuteaega, kuid täiendavat inkubeerimist ei ole nende puhul vaja.

Vedeliku ja pindaktiivse kemikaali puhul kokkupuutejärgse inkubatsiooniaja lõpus ning tahke kemikaali puhul, mis ei ole pindaktiivne, registreeritakse neljatunnise kokkupuuteaja lõpus iga sarvkesta hägusus ja läbilaskvus. Samuti vaadeldakse iga sarvkesta visuaalselt ja dokumenteeritakse kõik asjakohased tähelepanekud (näiteks koe irdumine, uuritava kemikaali jäägid, ebaühtlaselt jaotunud hägususe mustrid). Sellised tähelepanekud võivad olla olulised, kuna need erisused võivad mõjutada hägususmõõt näitu.

Kontrolli kemikaalid

Igas katses kasutatakse ka paralleelseid negatiivset või lahusti/vehiikuli kontrolli ja positiivseid kontrolle.

BCOP-katse läbiviimisel 100-protsendilise vedela ainega tehakse paralleelselt negatiivse kontrolli katse (näiteks 0,9 % naatriumkloriidi lahuse või destilleeritud veega), et kindlaks teha mittespetsiifiliste muutuste esinemine testsüsteemis ja saada katse näitajate lähteväärtused. Sellega tõendatakse ka, et katsetingimused ise ei põhjusta muutusi, mida ekslikult võiks ärrituseks pidada.

Lahjendatud vedeliku, pindaktiivse aine või tahkise testimisel lisatakse BCOP-katsesse paralleelne lahusti/vehiikuli kontrolli rühm, nii et oleks võimalik tuvastada testsüsteemi ebaspetsiifilisi muutusi ning saada katse näitajate lähteväärtused. Katses võib kasutada ainult sellist lahustit/vehiikulit, mille kohta on tõendatud, et sel ei ole kahjulikku toimet katsesüsteemile.

Igasse katsesse lisatakse positiivse kontrollina teadaolevalt positiivset reaktsiooni põhjustav kemikaal, veendumaks, et katsesüsteem on teviklik ja toimib õigesti. Kuid selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli kemikaali mõju sõltuvust ajast, ei tohiks ärritusreaktsioon olla ülemäära suur.

Vedelate positiivse kontrolli kemikaalide näited on 100-protsendiline etanool või 100-protsendiline dimetüülformamiid. Tahke positiivse kontrolli kemikaali näide on 20 % (w/v) imidasooli suspensioon 0,9 % naatriumkloriidi lahuses.

Võrdluskemikaalid võimaldavad hinnata teatavasse kemikaali- või tooteklassi kuuluva tundmatu kemikaali omadust põhjustada silmade ärritust või hinnata teatava silmi ärritava kemikaali toime võimalikkust ärritusreaktsiooni teatavas vahemikus.

Mõõdetavad näitajad

Hägusus määratakse sarvkesta läbinud valgushulga mõõtmisega. Sarvkesta hägusust mõõdetakse hägususmõõtja abil, millega saadakse hägususe väärtused pidevas skaalas.

Läbilaskvust määratakse värvaine naatriumfluorestseiini koguse järgi, mis tungib läbi kõigi sarvkesta kihtide (st sarvkesta välispinnal asuvast epiteelist kuni sisepinnal asuva endoteelini). Sarvkestahoidiku eesmisesse kambrisse, mille poole on sarvkesta epiteliaalne külg, lisatakse 1 ml naatriumfluorestseiini lahust (4 mg/ml, kui uuritav kemikaal on vedelik või pindaktiivne aine, ja 5 mg/ml, kui see on pindaktiivsete omadusteta tahkis), samas kui tagumine kamber, mille poole on

▼M7

endoteliaalne külg, täidetakse värske EMEMiga. Seejärel inkubeeritakse sarvkestahoidikut horisontaalasendis 90 ± 5 minutit temperatuuril 32 ± 1 °C. UV/VIS-spektrofotomeetriaga mõõdetakse tagumisse kambrisse tunginud naatriumfluorestseiini kogus. Lainepikkusel 490 nm läbiviidavate spektrofotomeetriliste mõõtmiste tulemused registreeritakse optilise tiheduse (OD490) või valguse neeldumise ühikutes pidevas skaalas. Fluorestseiini läbilaskvuse väärtused määratakse OD490 väärtustest, mis määratakse nähtava valguse spektrofotomeetriga, kasutades standardset optilise tee pikkust 1 cm.

Selle asemel võib kasutada 96-kannulise mikrotiiterplaadi lugejat, kui: i) on võimalik näidata, et fluorestseiini määramisel on OD490 väärtused plaadilugeja lineaarses piirkonnas, ja ii) 96-kannulisel mikrotiiterplaadil kasutatakse õiget fluorestseiiniproovi ruumala, nii et saadakse samad OD490 väärtused kui tavalise 1 cm optilise tee pikkusega mõõtmisel (selleks võib olla vaja täita kann täielikult (tavaliselt 360 µl)).

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete hindamine

Kui hägususe ja keskmise läbilaskvuse (OD490) väärtused on korrigeeritud tausthägususe ja negatiivse kontrolli läbilaskvuse OD490 väärtuste suhtes, tuleb iga katserühma keskmised hägususe ja läbilaskvuse OD490 väärtused asendada empiiriliselt tuletatud valemisse, et arvutada *in vitro*-ärritava toime hinne (IVIS) iga katserühma jaoks:

IVIS = keskmine hägususe väärtus + (15 × keskmine läbilaskvuse OD490 väärtus)

Sina jt (16) avaldasid, et see valem tuletati laborisiseste ja laboritevaheliste uuringutega. 36 ühendiga läbiviidud laboritevahelise uuringu andmeid analüüsiti mitmese korrelatsioonanalüüsiga, et leida *in vivo* ja *in vitro* saadud tulemuste seost kõige paremini kirjeldav võrrand. Kahe eri firma teadlased tegid selle analüüsi ja said peaaegu ühesugused võrrandid.

Hägususe ja läbilaskvuse väärtusi tuleks ka sõltumatult hinnata, et teha kindlaks, kas uuritav kemikaal põhjustas söövitust või tugevat ärritust ainult ühe kaudu kahest näitajast (vt Otsustamiskriteeriumid).

Otsustamiskriteeriumid

Selleks, et teha kindlaks IVISe läviväärtused, mille järgi uuritavaid kemikaale, mis põhjustavad rasket silmakahjustust (ÜRO GHSi 1. kategooria), eristatakse uuritavatest kemikaalidest, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi kategooriata kemikaal), on järgmised:

IVIS	ÜRO GHS
≤ 3	kategooriata
> 3; ≤ 55	ei ole võimalik prognoosida
> 55	1. kategooria

Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid

Katse loetakse nõuetekohaseks, kui positiivne kontroll annab IVISe väärtuse, mis erineb kuni kahe standardhälbe võrra varasemate uuringute jooksvast keskväärtusest, mida ajakohastatakse vähemalt iga kolme kuu järel või iga nõuetekohase katse läbiviimise järel laboris, kus katseid tehakse harva (harvem kui kord kuus). Negatiivse kontrolli või lahusti/vehiikuli kontrolli katses saadud hägususe ja läbilaskvuse väärtused peavad olema väiksemad kui tausthägususe ja -läbilaskvuse väärtuse ülempiirid, mis on varem kindlaks tehtud veise sarvkestadega, mida on töödeldud negatiivse kontrolli või lahusti/vehiikuli kontrolli kemikaalidega. Üksainus uuring vähemalt kolme sarvkestaga peaks olema piisav uuritava

▼M7

kemikaali kohta, kui klassifitseerimise tulemus on ühene. Kuid kui esimene uuring annab piiripealsed tulemused, tuleb kaaluda teise uuringu tegemist (mis ei ole tingimata nõutav), samuti kolmanda uuringu tegemist, kui esimese kahe uuringu IVISe keskmised väärtused ei ole kooskõlas. Selles kontekstis loetakse esimese uuringu tulemus piiripealseks, kui kolme sarvkestaga saadud tulemused ei ole kooskõlas, näiteks:

— kolmest sarvkestast kahega saadi tulemuseks prognoos, mis erines kõigi kolme sarvkestaga saadud keskväärtuse prognoosist, VÕI

— ühega kolmest sarvkestast saadi prognoos, mis erines kõigi kolme sarvkesta keskväärtusega saadud prognoosist, NING see hälbiv väärtus oli >10 IVIS ühikut erinev läviväärtusest 55.

— Kui kordusuuring kinnitab esialgse uuringu prognoosi (mis põhineb IVISe keskväärtusel), võib lõpliku otsuse teha ilma edasiste katseteta. Juhul kui kordusuuring tulemus on prognoos, mis on vastuolus esialgse uuringu IVISe keskväärtuse põhjal tehtud ennustusega, tuleb teha kolmas ja viimane katse, et lahendada nende prognooside vasturääkivus ja klassifitseerida uuritav kemikaal. Edasiste klassifitseerimise ja märgistamise katsete tegemisest võib olla lubatav loobuda, kui kas või üks katse näitab, et kemikaal kuulub ÜRO GHSi 1. kategooria kemikaalide hulka.

Katseprotokoll

Katseprotokollis tuleb esitada järgmine teave, kui see on uuringu läbiviimise seisukohast asjakohane:

Uuritavad ja kontrolli kemikaalid

— keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu struktuurikohane nimetus, mida kasutab Chemical Abstracts Service (CAS), seejärel muud nimetused, kui need on teada; CASi registreerimisnumber, kui on teada;

— kemikaali puhtus või segu koostis (massiprotsendina), kättesaadavas ulatuses;

— füüsikalis-keemilised omadused nagu füüsikaline olek, lenduvus, pH, püsivus, kemikaaliklass, lahustuvus vees, mis on olulised katse läbiviimiseks;

— uuritava kemikaali / kontrolli kemikaali töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

— püsivus, kui on teada.

Teave sponsori ja uurimisasutuse kohta

— sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

Katsemeetodi tingimused

— kasutatud hägususmõõtja (nt mudel ja spetsifikatsioonid) ning selle seadistused;

— teave hägususe ja läbilaskvuse mõõtmiseks kasutatud mõõteriista (näiteks hägususmõõtja ja spektrofotomeetri) kaliibrimise kohta, et tagada mõõtmiste lineaarsus;

— kasutatud sarvkestahoidiku tüüp (näiteks mudel ja spetsifikatsioonid);

▼M7

— muude kasutatud seadmete kirjeldus;

— meetodid, mida kasutati katsemeetodi tervikluse (st täpsuse ja usaldusväärsuse tagamiseks ajas (nt pädevuse kontrolli kemikaalide perioodiline mõõtmine).

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

— varasematel andmetel põhinevad paralleelse positiivse ja negatiivse kontrolli vastuvõetavad vahemikud;

— võimaluse korral varasematel andmetel põhinevad paralleelsete võrdluskontrollide vastuvõetavad vahemikud.

Silmade hankimine ja ettevalmistamine

— silmade päritolu kirjeldus (asutus, millest need saadi);

— sarvkesta läbimõõt kui loomade vanuse ja katseks sobivuse näitaja;

— silmade säilitamis- ja transporditingimused (näiteks silmade eemaldamise aeg, ajavahemik katse alguseni, transpordisööde ja temperatuuritingimused, kasutatud antibiootikumid);

— veise sarvkestade ettevalmistamine ja hoidikusse paigaldamine, sealhulgas nende kvaliteetsuse, sarvkestahoidiku temperatuuri ja sarvkestade katsesse valiku kriteeriumide kirjeldus.

Katse käik

— paralleelide arv;

— kasutatud negatiivse ja positiivse kontrolli kemikaalid (vajaduse korral ka lahusti ja võrdluskemikaalid);

— uuritava kemikaali kontsentratsioon(id), pealekandmine, kokkupuute kestus ja kokkupuutejärgsed inkubatsiooniaja kestus;

— kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;

— kasutatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kirjeldus;

— kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus;

— kasutatud otsustamiskriteeriumide kirjeldus.

Tulemused

— Iga katseprooviga saadud andmete tabel (näiteks hägususe ja OD490 väärtused ning uuritava kemikaali ja positiivse kontrolli, negatiivse kontrolli ning [võimaluse korral] võrdluskemikaali kontrolli jaoks arvutatud IVISe väärtused tabelina, sealhulgas vajaduse korral paralleelkorduskatsete tulemused, iga katse keskväärtused ± standardhälve);

— muude täheldatud toimete kirjeldus;

— *in vitro* määratud ÜRO GHSi klassifikatsioon, kui see on asjakohane.

Tulemuste arutelu

Kokkuvõte

▼**M7**

KIRJANDUS

(1) ICCVAM (2006). „Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives“. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) ja the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Kättesaadav aadressil: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ICCVAM (2010). „ICCVAM Test Method Evaluation Report. Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products“. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Kättesaadav aadressil: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(3) OECD (2013). „Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion“. *Series on Testing and Assessment*, No.189, OECD, Paris.

(4) UN (2011). „United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)“, ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Kättesaadav aadressil: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P. and Zuang, V. (2010). „A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches“. *Toxicol. in Vitro* 24: 1–9.

(6) ICCVAM (2006). „ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol“. In: „Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives“. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) ja the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Kättesaadav aadressil: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). „ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol“. In: „Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products“. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) ja the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Kättesaadav aadressil: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(8) INVITTOX (1999). „Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd.“ Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). „Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy“. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442–449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). „The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage?“ *Toxicol. in Vitro* 20: 78–81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). „Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings“. Kättesaadav aadressil: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). „Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays“. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(13) OECD (2011). „Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants“. *Series on Testing and Assessment*, No.160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). „Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse“. *Can. J. Zool.* 73: 2159–2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). „BSE: A decade on – Part I“. *The Lancet* 349: 636–641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D. and Miller, K. (1995). „A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates“. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

(17) Käesoleva lisa peatükk B.5 „Äge mürgisus: silmade ärritus/söövitus“.

(18) ICCVAM (2006). „Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method“. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Kättesaadav aadressil: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OECD (1998). *Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring*. No. 1: „OECD Principles on Good Laboratory Practice“ (läbi vaadatud 1997. a).

Kättesaadav aadressil: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

1. liide

MÕISTED

Aine – ooduslikud või mis tahes meetodi abil toodetud keemilised elemendid ja nende ühendid, mis võivad sisaldada toote stabiliseerimiseks vajalikke lisaaineid või tootmismeetodist tingitud lisandeid, kuid ei tohi sisaldada ühtki lahustit, mida on võimalik kemikaali stabiilsust vähendamata ja selle koostist muutmata eraldada (4);

Alt-üles lähenemisviis – astmeline lähenemisviis, kasutatakse kemikaali puhul, mille kohta võib oletada, et seda ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega; alustatakse klassifitseerimist mitte vajavate kemikaalide (negatiivne tulemus) eraldamisega muudest kemikaalidest (positiivne tulemus).

Astmelise katsetamise strateegia – etapiviisi katsetamise strateegia, milles enne järgmise etapiga alustamist vaadatakse uuritava kemikaali kohta kindlaksmääratud korras läbi kogu olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse analüüsi, et otsustada, kas teave on piisav ohuklassi määramiseks. Kui olemasoleva teabe põhjal saab uuritava kemikaali ärritava toime potentsiaali kohta otsuse teha, ei ole edasisi katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa otsustada uuritava kemikaali ärritava toime potentsiaali üle, jätkatakse järjestikuste loomkatsete etapiti tegemist, kuni kemikaali saab üheselt klassifitseerida.

Hägususmõõtja – seade sarvkesta hägususe mõõtmiseks sarvkesta läbinud valguse hulga kvantitatiivse hindamise alusel. Tüüpilisel seadmel on kaks mõõtmisruumi, millest kummalgi on oma valgusallikas ja fotoelement. Üht ruumi kasutatakse töödeldud sarvkesta mõõtmiseks; teine on seadme kaliibrimiseks ja nulliviimiseks. Halogeenlambi valgus suunatakse läbi võrdlusruumi (tühi kamber, millel ei ole aknaid ja milles ei ole vedelikku) fotoelemendile ja võrreldakse valgusega, mis on fotoelemendile suunatud läbi uuritava sarvkestaga ruumi. Fotoelementide andmete võrdlemisest saadakse valgusläbilaskvuse erinevus ja hägususe numbriline väärtus esitatakse digitaalsel näidikul.

***In vitro* ärritava toime hinne (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS)** – BCOP-katses kasutatav empiiriliselt tuletatud valem, millega iga katserühma keskmise hägususe ja keskmise läbilaskvuse väärtused ühendatakse üheks kõnealusele katserühmale avaldatud mõju iseloomustavaks *in vitro*-hindeks (punktisummaks). *IVIS* = keskmine hägususe väärtus + (15 × keskmine läbilaskvuse väärtus)

Kemikaal – aine või segu.

Klassifitseerimata – kemikaalid, mida ei klassifitseerita seoses silmaärritusega (ÜRO GHSi 2., 2A või 2B kategooria) või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi 1. kategooria). Samatähenduslik mõistega „ÜRO GHSi kategooriata“.

Lahusti/vehiikuli kontroll – uuritava kemikaaliga töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või vehiikulit; sellist proovi töödeldakse sarnaselt uuritava kemikaaliga töödeldud proovile ja muudele kontrolli proovidele, et määrata kindlaks samas lahustis või vehiikulis lahustatud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide tekitatud reaktsiooni lähtetase. Kui paralleelselt uuritakse negatiivse kontrolli proovi, siis näitab lahusti/vehiikuli proov ka seda, kas lahusti või vehiikul mõjutab katsesüsteemi.

Negatiivne kontroll – uuritava ainega töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Sellist proovi töödeldakse koos proovidega, mida mõjutatakse uuritava kemikaaliga, ja koos muude kontrolli proovidega, et kontrollida, ega lahusti ei mõjuta katsesüsteemi.

Ohtlikkus – mõjuri või olukorra iseloomulik omadus, millel võib olla kahjulik toime, kui organism, süsteem või (ala-)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Pindaktiivne aine – see on aine, näiteks detergent, mis võib vähendada vedeliku pindpinevust ja võimaldab sellel vahutada või tungida tahketesse ainetesse; sama mis märgav aine.

Pindaktiivset ainet sisaldav segu – käesoleva katsemeetodi kontekstis segu, mis sisaldab ühte või mitut pindaktiivset ainet lõplikus kontsentratsioonis > 5 %.

▼M7

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida töödeldakse kemikaaliga, mis teadaolevalt põhjustab positiivse tulemuse. Selleks et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli kemikaali mõju sõltuvust ajast, ei tohiks mõju olla ülemäära suur.

Pöördumatu toime silmale – vt „Raske silmakahjustus“.

Pöörduv toime silmale – vt „Silmade ärritus“.

Raske silmakahjustus – koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat kemikaali on kantud silma eespoolsele pinnale ja mõju ei ole täielikult pöörduv 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist. Samatähenduslik mõistetega „Pöördumatu toime silmale“ ja „ÜRO GHSi 1. kategooria“ (4).

Sarvkest – silmamuna eesmise osa läbipaistev kest, mis katab vikerkesta ja pupilli ning laseb valgusel tungida silma sisse.

Sarvkesta hägusus – suurus, millega väljendatakse pärast kokkupuudet uuritava kemikaaliga toimunud sarvkesta hägustumise ulatust. Sarvkesta suurenenud hägusus näitab sarvkesta kahjustust. Hägusust võib hinnata subjektiivselt, nagu tehakse Draize'i katses küülikusilmaga, või objektiivselt aparaadiga, näiteks hägususmõõtjaga.

Sarvkesta läbilaskvus – sarvkesta epiteeli kahjustuse kvantitatiivne mõõtmine värvaine naatriumfluorestseiini koguse järgi, mis tungib läbi kõigi sarvkesta kihtide.

Segu – segu või lahus, mis koosneb kahest või enamast ainest, mis omavahel ei reageeri (4).

Silmade ärritus – selliste muutuste tekkimine silmas pärast seda, kui uuritavat kemikaali on manustatud silma eespinnale, mis on täielikult pöörduvad 21 päeva jooksul pärast manustamist. Mõiste on samatähenduslik mõistetega „Pöörduv toime silmale“ ja „ÜRO GHSi 2. kategooria“ (4).

Tõendusmaterjali kaalukuse hindamine – protsess, milles kaalutakse mitmesuguste andmete tugevaid ja nõrku külgi, et jõuda otsuseni kemikaali võimaliku ohtlikkuse kohta ja toetada sellist otsust.

Täpsus – katsemeetodi tulemuste lähedus kokkulangemisele kinnitatud võrdlusväärtustega. Täpsusega mõõdetakse katsemeetodi toimivust ja see on üks asjakohasuse aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka kordustäpsuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse.

Usaldusväärsus – katsemeetodiga aja jooksul saadud tulemuste laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ulatuse mõõt, kui katset tehakse sama katse-eeskirja alusel. Seda hinnatakse laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ja laborisisese korduvuse arvutamisega.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valenegatiivsete tulemuste määr – kõikide selliste positiivsete kemikaalide osakaal, mis on katsemeetodi alusel ekslikult tunnistatud negatiivseks. See on katsemeetodi toimivuse üks näitajaid.

▼M7

Valepositiivsete tulemuste määr – kõikide selliste negatiivsete kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud positiivseks. See on katsemeetodi toimivuse üks näitajaid.

Valideeritud katsemeetod – katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi suhtes. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse poolest, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi saavutamise seisukohast.

Võrdluskemikaal – kemikaal, mida kasutatakse uuritava kemikaali võrdlusstandardina. Võrdluskemikaalil peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritavate kemikaalidega; iii) teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate toimete kohta ja v) teadaolev mõjusus soovitavas mõjuvahemikus.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS (*Globally Harmonized System*)) – süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (4).

Ülalt-alla lähenemisviis – astmeline lähenemisviis, kasutatakse kemikaali puhul, mille kohta võib oletada, et see tekitab rasket silmakahjustust; alustatakse rasket silmakahjustust tekitavate kemikaalide (positiivne tulemus) eraldamisega muudest kemikaalidest (negatiivne tulemus).

ÜRO GHSi 1. kategooria – vt „Raske silmakahjustus“.

ÜRO GHSi 2. kategooria – vt „Silmade ärritus“.

ÜRO GHSi kategooriata – kemikaalid, mis ei vasta ÜRO GHSi 1. kategooria või 2. (2A või 2B) kategooria nõuetele. Sama mis „Klassifitseerimata“.

▼M7

2. liide

BCOP-KATSEMEETODI PROGNOOSIVÕIME

Tabel 1

Veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*, BCOP) katsemeetodi prognoosivõime rasket silmakahjustust tekitavate kemikaalide kindlakstegemisel [ÜRO GHSi / ELi CLP-määruse 1. kategooria *vs.* mitte 1. kategooria (2. kat. + kategooriata); US EPA I kategooria *vs.* mitte I kategooria (II kat. + III kat. + IV kat.)]

Klassifitseerimis süsteem	nr	Täpsus		Tundlikkus		Valenegatiivsed		Spetsiifilisus		Valepositiivsed	
		%	nr	%	nr	%	nr	%	nr	%	nr
ÜRO GHS ELi CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
USA Keskkonna-kaitseamet (US EPA)	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabel 2

BCOP-katse prognoosivõime selliste kemikaalide kindlakstegemisel, mis ei vaja klassifitseerimist seoses silmaärrituse või raske silmakahjustusega („mitte ärritavad kemikaalid“) [ÜRO GHSi / ELi CLP-määruse kategooriata kemikaal *vs.* mitte kategooriata kemikaal (1. kat. + 2. kat.); US EPA IV kategooria *vs.* mitte IV kategooria (I kat. + II kat. + III kat.)]

Klassifitseerimis süsteem	nr	Täpsus		Tundlikkus		Valenegatiivsed		Spetsiifilisus		Valepositiivsed	
		%	nr	%	nr	%	nr	%	nr	%	nr
ÜRO GHS ELi CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
USA Keskkonna-kaitseamet (US EPA)	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

3. liide

BCOP-KATSEMEETODI PÄDEVUSE KONTROLLI KEMIKAALID

Enne käesoleva katsemeetodi tavakasutusse võtmist peaks labor tõendama tehnilist pädevust ja selleks õigesti klassifitseerima tabelis 1 soovitatud 13 silmadele ohtlikku kemikaali. Kõnealused kemikaalid on valitud nii, et need esindaksid silma ohutegurite põhjustatud reaktsioonide vahemikku, mis põhineb *in vivo* küüliku silma katse (katsemeetod 405) (17) ja ÜRO GHSi klassifitseerimise süsteemi (see tähendab 1. kategooria, 2A, 2B kategooria või klassifitseerimata) tulemustel (4). Peale selle arvestati kemikaalide valimisel järgmisi kriteeriume: kaubanduslik kättesaadavus, kvaliteetsete *in vivo* võrdlusandmete olemasolu ja BCOP-katsemeetodiga saadud kvaliteetsete *in vitro* andmete olemasolu. Võrdlusandmed on esitatud lihtsustatud kokkuvõtlikus dokumendis 3 ja ICCVAMi taustaülevaates BCOP-katsemeetodi kasutamise kohta (2, 18).

Tabel 1

Soovitatavad tehnilise pädevuse tõendamise kemikaalid BCOP-katsemeetodi jaoks

Kemikaal	CASi nr	Keemiliste ainete klass (1)	Füüsikaline olek	*In vivo* klassifikatsioon (2)	Klassifikatsioon BCOP-katse alusel
bensalkooniumkloriid (5 %)	8001-54-5	ooniumühend	vedelik	1. kategooria	1. kategooria
kloorheksidiin	55-56-1	amiin, amidiin	tahke	1. kategooria	1. kategooria
dibensoüül-L-viinhape	2743-38-6	karboksüülhape, ester	tahke	1. kategooria	1. kategooria
imidasool	288-32-4	heterotsükkel	tahke	1. kategooria	1. kategooria
trikloroäädikhape (30 %)	76-03-9	karboksüülhape	vedelik	1. kategooria	1. kategooria
2,6-diklorobensoüülkloriid	4659-45-4	atsüülhaliid	vedelik	2A kategooria	täpne/usaldusväärne prognoos ei ole võimalik
etüül-2-metüülatsetoatsetaat	609-14-3	ketoon, ester	vedelik	2 B kategooria	täpne/usaldusväärne prognoos ei ole võimalik
ammooniumnitraat	6484-52-2	anorgaaniline sool	tahke	2. kategooria (3)	täpne/usaldusväärne prognoos ei ole võimalik
EDTA dikaaliumsool	25102-12-9	amiin, karboksüülhape (sool)	tahke	klassifitseerimata	klassifitseerimata
Tween 20	9005-64-5	ester, polüeeter	vedelik	klassifitseerimata	klassifitseerimata
2-merkaptopürimidiin	1450-85-7	atsüülhaliid	tahke	klassifitseerimata	klassifitseerimata
fenüülbutasoon	50-33-9	heterotsükkel	tahke	klassifitseerimata	klassifitseerimata

▼**M7**

Kemikaal	CASi nr	Keemiliste ainete klass (1)	Füüsikaline olek	*In vivo* klassifikatsioon (2)	Klassifikatsioon BCOP-katse alusel
polüoksüetüleen-23-laurüüleeter (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	alkohol	vedelik	klassifitseerimata	klassifitseerimata

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number.

(1) Kemikaaliklass on igale uuritavale ainele omistatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniraamatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (vt http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Põhineb küüliku silma in vivo katse (OECD TG 405) (17) tulemustel ja selles kasutatakse ÜRO GHSi (4).

(3) Klassifitseerimine 2A või 2B kategooriasse sõltub ÜRO GHSi kriteeriumi tõlgendusest, mille alusel eristatakse neid kahte kategooriat, st üks kolmest või kaks kolmest loomast, kellel 7. päeval avaldub veel mõju, on vajalik(ud) selleks, et klassifitseerida kemikaal 2A kategooriasse. In vivo uuringus kasutati kolme looma. Kõik näitajad peale sidekesta punetuse ühel loomal paranesid hindeni 0 seitsmendaks päevaks või varem. Ühel loomal, kes ei paranenud täielikult 7. päevaks, oli 7. päeval sidekesta punetuse hinne 1, kuid sidekest oli täielikult paranenud 10. päevaks.

▼M7

4. liide

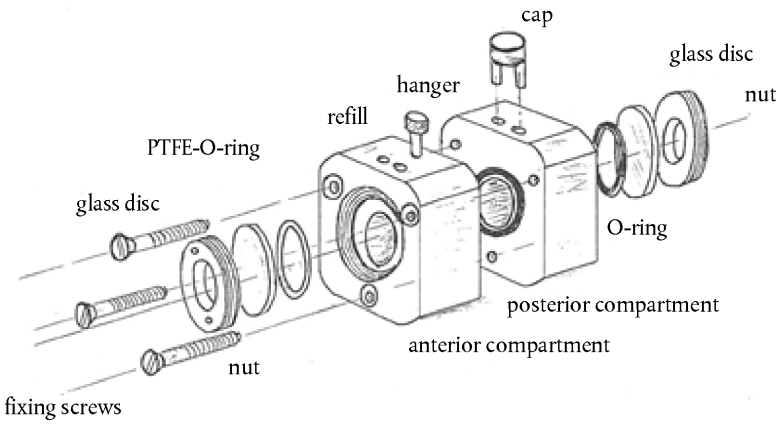
BCOP-KATSE SARVKESTAHOIDIK

BCOP-katses kasutatav sarvkestahoidik valmistatakse inertsest materjalist (näiteks polüpropüleenist). Sarvkestahoidikul on kaks poolt (eesmine ja tagumine kamber) ja nendes on sarnased silindrilised sisekambrid. Kummagi kambri maht on umbes 5 ml ja kumbki kamber lõpeb klaasist aknaga, läbi mille mõõdetakse hägusust. Kummagi sisekambri diameeter on 1,7 cm ja sügavus 2,2 cm ([1]). Tagumise kambri rõngastihendit kasutatakse lekete ärahoidmiseks. Sarvkest paigutatakse endoteliaalse küljega tagumise kambri rõngastihendile ja eesmine kamber paigutatakse sarvkesta epiteliaalsele küljele. Kambreid hoiavad paigal kolm roostevabast terasest kruvi, mis asuvad kambri välisservadel. Kummagi kambri otsas on eemaldatav klaasaken, mis võimaldab hõlpsat juurdepääsu sarvkestale. Üks rõngastihend on ka klaasakna ja kambri vahel, et vältida lekkimist. Kaks ava kummagi kambri ülemisel küljel võimaldavad lisada ja eemaldada lahustit ja uuritavat kemikaali. Kemikaaliga kokkupuute ja inkubeerimise ajal on avad suletud kummikorkidega. Sarvkestahoidikute valgusläbilaskvus võib muutuda hoidikute kulumise tõttu või teatavate kemikaalijääkide kogunemise tõttu sisekambrisse või klaasakendele, mis võib mõjutada valguse hajumist või peegeldumist. Tagajärjeks võib olla sarvkestahoidikute valgusläbilaskvuse lähtetaseme suurenemine või vähenemine (ja hägususe lähtetaseme lugemite vastupidised muutused) ning need võivad avalduda iga kambri sarvkesta hägususe lugemite eeldatavate lähteväärtuste oluliste muutustena (st sarvkesta hägususe lähteväärtuse lugem konkreetses sarvkestahoidikus võib tavaliselt erineda üle 2 või 3 hägususe ühiku eeldatavast lähteväärtusest). Iga labor peaks kaaluma võimalust koostada kava sarvkestahoidiku valgusläbilaskvuse muutuste hindamiseks, sõltuvalt uuritava kemikaali keemilisest koostisest ja kambrite kasutussagedusest. Lähteväärtuste kindlakstegemiseks võib sarvkestahoidikuid kontrollida enne tavakasutust; selleks mõõdetakse täissöötmega täidetud kambrite hägususe lähteväärtusi (või valgusläbilaskvust) ilma sarvkestadeta. Edasiste kasutusperioodide ajal kontrollitakse sarvkestahoidikuid regulaarselt, et teha kindlaks valgusläbilaskvuse muutusi. Iga labor võib ise määrata sarvkestahoidikute kontrollimise sageduse, arvestades uuritavate kemikaalide keemilist koostist, kasutussagedust ja sarvkesta hägususe lähteväärtuste täheldatud muutumist. Kui täheldatakse sarvkestahoidikute valgusläbilaskvuse olulisi muutusi, tuleb kaaluda sarvkestahoidikute sisepindade asjakohast puhastamist ja/või poleerimist või hoidjate asendamist.

([1]) Esitatud mõõtmetega sarvkestahoidikut kasutatakse 12–60 kuu vanuse lehma sarvkesta puhul. Kui kasutatakse 6–12 kuu vanuse looma sarvkesta, peab sarvkestahoidik olema projekteeritud nii, et kummagi kambri ruumala on 4 ml ning kummagi sisekambri diameeter on 1,5 cm ja sügavus 2,2 cm. Uue konstruktsiooniga sarvkestahoidiku puhul on väga oluline, et ainega kokkupuutuva sarvkestaosa pindala ja tagumise kambri ruumala suhe oleks samasugune kui tavalise sarvkestahoidiku puhul. Selle tagamine on oluline selleks, et määrata õigesti läbilaskvuse väärtused, mida kasutatakse IVISe väärtuse arvutamiseks esitatud valemi järgi.

▼M7

Sarvkestahoidik – Koostejoonis



▼M7

5. liide

HÄGUSUSMÕÕTJA

Hägususmõõtja on seade valgusläbilaskvuse mõõtmiseks. Näiteks seadme OP-KIT (Riom, Prantsusmaa) puhul, mida kasutati BCOP-katsemeetodi valideerimisel, suunatakse halogeenlambi valgus läbi võrdlusruumi (tühi kamber, millel ei ole aknaid ja milles ei ole vedelikku) fotoelemendile ja võrreldakse valgusega, mis on fotoelemendile suunatud läbi uuritava sarvkestaga ruumi. Fotoelementide andmete võrdlemisest saadakse valgusläbilaskvuse erinevus ja hägususe numbriline väärtus esitatakse digitaalsel näidikul. Tehakse kindlaks hägususühikud. Võib kasutada ka muud tüüpi hägususmõõtjat (näiteks sellist, mille puhul ei ole vaja mõõta paralleelselt kontrollruumi ja uuritava sarvkestaga ruumi läbivat valgust), kui on tõendatud, et seade annab valideeritud seadmega sarnaseid tulemusi.

Hägususmõõtja peaks tagama lineaarse sõltuvuse kogu hägususe lugemite vahemikus, mis ulatub prognoosimudelis kirjeldatud eri klassifikatsioonides kasutatavate läviväärtusteni (st kuni läviväärtusteni, mille alusel aine tunnistatakse söövitavaks või tugevasti ärritavaks). Lineaarsete ja täpsete lugemite saamiseks kuni 75–80 hägususühikuni on hägususmõõtja vaja kaliibrida, kasutades kalibraatorite seeriat. Kalibraatorid pannakse kaliibrimiskambrisse (sarvkestahoidik, millesse saab panna kalibraatori) ja võetakse hägususmõõtja lugem. Kaliibrimiskamber on projekteeritud nii, et see hoiaks kalibraatoreid ligikaudu samal kaugusel valgusallikast ja fotoelemendist, nagu oleksid sarvkestad hägususe mõõtmise ajal. Võrdlusväärtused ja lähteväärtus sõltuvad kasutatavast seadmest. Hägususe mõõtmiste lineaarsus tuleb tagada asjakohaste (konkreetsest seadmest sõltuvate) meetmetega. Näiteks Electro Design'i (Riom, Prantsusmaa) seadme OP-KIT puhul kaliibritakse hägususmõõtja esmalt lugemile 0, milleks kasutatakse kaliibrimiskambrit ilma kalibraatorita. Seejärel paigutatakse kaliibrimiskambrisse ükshaaval kolm eri kalibraatorit ja mõõdetakse nende hägusus. Kalibraatoritega 1, 2 ja 3 tuleb saada nende ettenähtud hägususväärtuste lugemid, vastavalt 75, 150 ja 225 hägususe ühikut ± 5 %.

▼M7

B.48. ISOLEERITUD KANASILMA KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEOSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 438 (2013). Isoleeritud kanasilma (*Isolated Chicken Eye*, ICE) katsemeetodit hinnati alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) poolt koostöös alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskuse (ECVAM) ja alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskusega (JaCVAM) 2006. ja 2010. aastal (1–3). Esimesel hindamisel toetati ICE-meetodit kui teaduslikult põhjendatud sõeluuringukatset selleks, et teha kindlaks kemikaale (aineid ja segusid), mis põhjustavad rasket silmakahjustust (1. kategooria), nagu need on määratletud Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni (ÜRO) ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1, 2, 4) ja määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP) ([1]). Teisel hindamisel hinnati ICE-katsemeetodi kasulikkust sõeluuringumeetodina selliste kemikaalide kindlakstegemisel, mida ÜRO GHSi kohaselt ei klassifitseerita seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (3, 4). Valideerimisuuringu tulemuste ja ekspertide hindamiskomisjoni soovituste kohaselt jäeti kehtima esialgne soovitus kasutada ICE-katset rasket silmakahjustust tekitavate kemikaalide klassifitseerimiseks (ÜRO GHSi 1. kategooria), kuna olemasolev andmebaas jäi pärast esialgset ICCVAMi-poolset valideerimist muutumatuks. Sellel etapil ei esitatud täiendavat soovitust laiendada ICE-katsemeetodi kohaldamisala muudesse kategooriatesse kuuluvate kemikaalide kindlakstegemisele. Selleks et kindlaks teha, kas ICE-katsemeetodit saab kasutada selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustuse tekitamisega, tehti valideerimisuuringus kasutatud *in vitro* ja *in vivo* andmete ümberhindamine (5). Sellel ümberhindamisel tehti järeldus, et ICE-katsemeetodit saab kasutada ka selliste kemikaalide väljaselgitamiseks, mida ÜRO GHSi järgi ei ole vaja klassifitseerida silmade ärrituse või raske silmakahjustuse tekitajaks (4, 5). Käesolevas katsemeetodis on esitatud ICE-katsemeetodi soovitatav kasutusala ja piirangud, mis põhinevad nimetatud hindamistel. Peamised erinevused (neid on veel muidki) 2009. aasta esialgse OECD katsejuhendi ja 2013. aasta ajakohastatud versiooni vahel seisnevad selles, et uues versioonis kasutatakse ICE-meetodit selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja klassifitseerida ÜRO GHSi kohaselt, uuendatud on katseprotokollis esitatava teabe elemente, mõisteid 1. liites ja pädevuse kontrolli kemikaale 2. liites.

Praegu ollakse üldiselt arvamusel, et lähitulevikus ei ole võimalik ärritava toime kogu ulatuse prognoosimisel eri kemikaaliklasside puhul ühegi *in vitro* silmaärrituse katsega asendada Draize'i *in vivo* silmakatset. Kuid mitme alternatiivse testi strateegilise (astmelise) kombineerimisega võib siiski olla võimalik asendada Draize'i silmakatset (6). Ülalt-alla lähenemisviisi (7) tuleks kasutada siis, kui olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et kemikaal võib silma tugevasti ärritada; alt-üles lähenemisviisi (7) tuleks kasutada siis, kui olemasoleva teabe põhjal ei peaks kemikaal põhjustama piisavat silma ärritust, mis nõuaks klassifikatsiooni. ICE-meetod on *in vitro* katsemeetod, mida võib kasutada teatavatel asjaoludel ja teatavate konkreetsete piirangutega, mida on selgitatud punktides 8–10, silmade jaoks ohtlike kemikaalide klassifitseerimiseks ja märgistamiseks. Seda ei peeta katsemeetodiks, mis üksinda võiks asendada küüliku *in vivo* silmakatset, kuid ICE-katsemeetodit soovitatakse kasutada esimese etapina ülalt-alla katsetamisstrateegias, mida soovitasid Scott jt (7) sellise kemikaali kindlakstegemiseks, mis tekitab rasket silmakahjustust, st mis tuleb ÜRO ühtse ülemaailmse süsteemi

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼M7

kohaselt klassifitseerida 1. kategooriasse ilma edasiste uuringuteta (4). ICE-meetodit soovitatakse ka selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis ei vaja klassifitseerimist seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses süsteemis (ÜRO GHSi kategooriata kemikaal) (4), ja seepärast võib seda kasutada esimese etapina alt-üles strateegilise lähenemisviisi puhul (7). Kemikaal, mille puhul ICE-katsemeetodiga ei prognoosita raske silmakahjustuse tekitamist või kuulumist silmaärrituse või raske silmakahjustuse seisukohast klassifitseerimist vajavaks kemikaaliks, vajab siiski täiendavat (*in vitro* ja/või *in vivo*) uurimist, et saaks määrata lõpliku klassifikatsiooni. Peale selle tuleks konsulteerida asjakohaste reguleerivate asutustega, enne kui ICE-katset hakatakse muu klassifitseerimisskeemi kui ÜRO GHS korral kasutama alt-üles lähenemisviisi rakendamiseks.

Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada protseduure, millega hinnatakse uuritava kemikaali võimalikku ohtlikkust silmale selle võime kaudu põhjustada toksilisi reaktsioone enukleeritud kanasilmas. Toksilist mõju sarvkestale mõõdetakse: i) hägususe kvalitatiivse hindamisega, ii) epiteelikahjustuse kvalitatiivse hindamisega, kasutades fluorestseiini kandmist silma (fluorestseiini peetumine silmas), iii) sarvkesta paksuse suurenemise (turse) mõõtmisega ja iv) makroskoopilise morfoloogilise pinnakahjustuse kvalitatiivse hindamisega. Sarvkesta hägusust, turset ja kahjustust hinnatakse pärast uuritava kemikaaliga kokkupuutumist individuaalselt ja seejärel andmed koondatakse silma ärritava toime klassifitseerimiseks.

Mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

Käesolev katsemeetod põhineb alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) juhenddokumendis 160 (8) soovitatud metoodikal, mis töötati välja pärast ICCVAMi rahvusvahelist valideerimisuuringut (1, 3, 9), millesse andsid oma panuse alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskus (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM), alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskus (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) ja Madalmaade uurimisinstituudi TNO toksikoloogia ja rakendusfarmakoloogia elukvaliteedi osakond (TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology). Eeskirja aluseks on avaldatud andmetest saadud teave, samuti TNOs praegu kasutatav eeskiri (10–14).

Käesoleva katsemeetodi valideerimiseks uuriti paljusid kemikaale; valideerimise empiirilises andmebaasis on 152 kemikaali, sealhulgas 72 ainet ja 80 segu (5). Meetodit saab kasutada tahkete ainete, vedelike, emulsioonide ja geelide korral. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Gaase ja aerosoole ei ole valideerimisuuringuga veel hinnatud.

ICE-meetodit saab kasutada selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis tekitavad rasket silmakahjustust ja mis tuleb klassifitseerida ÜRO GHSi 1. kategooriasse (4). Selleks otstarbeks kasutamise korral on leitud järgmised ICE-katsemeetodi piirangud: alkoholide puhul saadakse sageli valepositiivseid tulemusi ning tahkete ja pindaktiivsete ainete korral valenegatiivseid tulemusi (1, 3, 9). Saadud valenegatiivsete tulemuste määr (ÜRO GHSi 1. kategooria kemikaale ei määrata ÜRO GHSi 1. kategooriasse) ei ole kõnealuses kontekstis siiski kriitiline, kuna kõiki uuritavaid kemikaale, mis tunnistatakse negatiivseks, uuritakse hiljem muude asjakohaselt valideeritud *in vitro* testi(dega) või viimase võimalusena, sõltuvalt regulatiivsetest nõuetest, katsetes küülikutega, kasutades järjestikuste katsete tegemise strateegiat ja tõendite kaalukuse lähenemisviisi.

▼**M7**

Tuleks märkida, et tahke kemikaal võib põhjustada erinevaid ja päris äärmuslikke kokkupuutetingimusi *in vivo* Draize'i silmade ärrituse katses, mis ei tarvitse võimaldada õigesti prognoosida aine tegelikku ärritavat toimet (15). Teadlased võiksid kaaluda kõnealuse meetodi kasutamist iga tüüpi kemikaalide puhul, kusjuures positiivne tulemus tuleks lugeda tõendiks, et kemikaal põhjustab rasket silmakahjustust ja tuleks liigitada ÜRO GHSi 1. kategooriasse ilma edasiste katseteta. Alkoholidega saadud positiivseid tulemusi tuleks tõlgendada ettevaatusega, kuna nende puhul on oht mõju üle hinnata.

Kui ICE-katsemeetodit kasutatakse selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis tekitavad rasket silmakahjustust (ÜRO GHSi 1. kategooria), on ICE-katsemeetodi kogutäpsus 86 % (120/140), valepositiivsete tulemuste määr on 6 % (7/113) ja valenegatiivsete tulemuste määr 48 % (13/27), võrreldes küüliku silma *in vivo* katsemeetodi andmetega, mis on klassifitseeritud ÜRO GHSi klassifitseerimise süsteemi järgi (4, 5).

ICE-meetodit saab kasutada ka selleks, et selgitada välja kemikaale, mida ÜRO GHSi järgi ei ole vaja klassifitseerida silmade ärrituse või raske silmakahjustuse tekitajaks (4). Tuleks konsulteerida asjakohaste reguleerivate asutustega, enne kui ICE-katset hakatakse muu klassifitseerimisskeemi kui ÜRO GHS korral kasutama alt-üles lähenemisviisi rakendamiseks. Kõnealust katsemeetodit võib kasutada iga tüüpi kemikaalide puhul, kusjuures negatiivse tulemuse võib aktsepteerida kui tõendi, et kemikaali ei ole vaja klassifitseerida seoses silmaärrituse või raske silmakahjustuse tekitamisega. Ühe valideerimise andmebaasis oleva tulemuse põhjal tuleb siiski arvestada, et orgaanilist lahustit sisaldavate kattumisvastaste värvide puhul võidakse raske silmakahjustuse tekitamise võimet alahinnata (5).

Kui ICE-katsemeetodit kasutatakse selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis ei vaja klassifitseerimist seoses silmaärrituse või raske silmakahjustuse tekitamisega, on ICE-katsemeetodi kogutäpsus 82 % (125/152), valepositiivsete tulemuste määr on 33 % (26/79) ja valenegatiivsete tulemuste määr 1 % (1/73), võrreldes küüliku silma *in vivo* katsemeetodi andmetega, mis on klassifitseeritud ÜRO GHSi järgi (4, 5). Kui andmebaasist jäetakse välja teatavad kemikaalide klassid (st orgaanilist lahustit sisaldavad kattumisvastased värvid), on ICE-katsemeetodi täpsus 83 % (123/149), valepositiivsete tulemuste määr on 33 % (26/78) ja valenegatiivsete tulemuste määr 0 % (0/71) ÜRO GHSi klassifikatsiooni süsteemi korral (4, 5).

ICE-meetodit ei soovitata kasutada sellise uuritava kemikaali kindlakstegemiseks, mis tuleks klassifitseerida silmi ärritavaks (ÜRO GHSi 2. või 2A kategooria) või silmi nõrgalt ärritavaks (ÜRO GHSi 2B kategooria), kuna sellega on palju ÜRO GHSi 1. kategooria kemikaale klassifitseeritud liiga madalasse kategooriasse, nagu ÜRO GHSi 2., 2A või 2B kategooria; samuti on ÜRO GHSi kategooriata kemikaale klassifitseeritud liiga kõrgesse kategooriasse, nagu ÜRO GHSi 2., 2A või 2B kategooria. Selleks võib vaja minna täiendavaid uuringuid muu sobiva meetodiga.

Kanasilmadega tehtavate kõigi toimingute puhul tuleb järgida katselabori kohaldatavaid inim- või loomset päritolu materjalide, kaasa arvatud (kuid mitte ainult) kudede ja koevedelike käsitsemise eeskirju ja korda. Soovitatakse järgida üldisi laboratoorseid ohutusnõudeid (16).

ICE-katsemeetodiga ei uurita sidekesta ega vikerkesta vigastusi, mida uuritakse küüliku silmaärrituse tekitamise katsega; sellega uuritakse toimet sarvkestale, mis on põhiline alus *in vivo* klassifitseerimisel, kui kaalutakse klassifitseerimist vastavalt ÜRO GHSile. Kuigi ICE-katsemeetodiga ei saa iseenesest hinnata sarvkestakahjustuste pöörduvust, on küüliku silma uuringute alusel soovitatud kasutada

▼M7

sarvkestakahjustuse esialgse sügavuse hindamist mõne tüübi pöördumatu mõju kindlakstegemiseks (17). Eelkõige on vaja täiendavaid teaduslikult põhjendatud teadmisi, et mõista, kuidas tekib pöördumatu mõju, mis ei ole seotud esialgse raske vigastusega. Lõpuks ei võimalda ICE-katsemeetod hinnata silma kokkupuutega kaasneva süsteemse toksilisuse võimalikkust.

Kõnealust meetodit ajakohastatakse korrapäraselt uue teabe ja andmete põhjal. Näiteks võib olla kasulik histopatoloogiline uuring, kui sarvkesta kahjustust on vaja täielikumalt kirjeldada. Selle võimaluse hindamiseks innustatakse meetodi kasutajaid silmi säilitama ja valmistama histopatoloogilisi preparaate, mida saab kasutada andmebaasi ja otsustamiskriteeriumide väljatöötamiseks, mille abil võib selle meetodi täpsust parandada. OECD on välja töötanud juhised *in vitro* katsemeetodite kasutamise kohta silmatoksilisuse määramiseks, milles on esitatud üksikasjalikud juhendid histopatoloogiliste proovide võtmise kohta, samuti teave, kuhu tuleks saata proovid ja/või histopatoloogia andmed (8).

Iga labor, kes alustab katsemeetodi kasutamist, peaks pädevuse tõendamiseks kasutama 2. liites esitatud kemikaale. Labor võib osutatud kemikaale kasutada selleks, et tõendada oma tehnilist pädevust ICE-katse läbiviimisel, enne kui ta esitab ICE-katsemeetodiga saadud andmed regulatiivseks ohu klassifitseerimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

ICE-meetod on organotüüpne mudel, mille abil on lühiajaliselt võimalik säilitada kanasilma *in vitro*. Katsemeetodis hinnatakse uuritava kemikaali põhjustatud kahjustust, määrates sarvkesta turset, hägusust ja fluorestseiini peetumist. Viimase kahe näitaja puhul on tegemist kvalitatiivse hindamisega, sarvkesta turse analüüsi puhul on ette nähtud kvantitatiivne hindamine. Iga mõõtmise tulemus teisendatakse kas kvantitatiivseks punktisummaks (hindeks), mida kasutatakse ärritava toime üldnäitaja arvutamiseks, või omistatakse sellele kvalitatiivne kategooria, mida kasutatakse silma suhtes *in vitro* ohuklassi määramiseks, st kemikaali määramiseks kas ÜRO GHSi 1. kategooriasse või ÜRO GHSi kategooriata kemikaaliks. Kumbagi neist tulemustest võib kasutada selleks, et prognoosida raske silmakahjustuse tekitamist *in vivo* või vajaduse puudumist klassifitseerida kemikaali seoses ohtlikkusega silmadele (vt otsustamise kriteeriumid). ICE-meetodiga ei saa siiski klassifitseerida kemikaale, mille puhul ei prognoosita raske silmakahjustuse tekitamist või mis ICE-katse põhjal ei vaja klassifitseerimist (vt punkt 11).

Kanasilmade hankimine ja kasutatavate kanade vanus

Kõnealuseks katseks on hakatud kasutama kanasilmi, mis saadakse tapamajadest, kus kanad tapetakse inimtoiduks; see kõrvaldab katseloomade kasutamise vajaduse. Kasutatakse üksnes silmi, mis on võetud tervetelt lindudelt, keda peetakse sobivaks inimtoidus kasutamiseks.

Kuigi kanade sobivaima vanuse hindamiseks ei ole läbi viidud kontrollitud uuringut, on tavaliselt kasutatud kõnealuseks katseks tapamajas tapetud kevadisi kanu (st vanus umbes 7 nädalat, kehamass 1,5–2,5 kg).

Silmade hankimine ja transport laborisse

Pead tuleb eemaldada kohe pärast kanade uimastamist, tavaliselt elektrivooluga, ja veretustamist kaelale tehtava lõikega. Tuleb leida lähim kohalik tapamaja labori lähedal, nii et kanade pead saaks piisavalt kiiresti viia tapamajast laborisse, et minimeerida lagunemist ja/või bakteritega saastumist. Ajavahemik kanapeade saamisest kuni silmade paigutamiseni pärast nende enukleatsiooni superfusioonikambrisse peaks olema võimalikult lühike (tavaliselt kuni kaks tundi), et tagada katse nõuetekohasuse kriteeriumide täitmine. Kõik katses kasutatavad silmad peavad olema ühest ja samast silmade rühmast, mis on võetud ühel konkreetsel päeval.

▼M7

Kuna silmad prepareeritakse laboris, tuuakse kanade pead tervelt tapamajast laborisse toatemperatuuril (tavaliselt 18–25 °C) plastkastides, milles niiskuse suurendamiseks on isotoonilise keedusoolalahusega niisutatud paberrätid.

Valikukriteeriumid ja ICE-katses kasutatavate silmade arv

Silmi, millel pärast silmakoopast eemaldamist on kõrge fluorestseiiniga värvumise lähtetase (üle 0,5) või sarvkesta hägususe hinne (üle 0,5), katses ei kasutata.

Igas katserühmas ja paralleelses positiivse kontrolli rühmas kasutatakse vähemalt kolme silma. Negatiivse kontrolli rühmas või lahusti kontrollis (kui kasutatakse muud lahustit kui keedusoolalahust) kasutatakse vähemalt ühte silma.

Tahkete ainete puhul, mille tulemus GHSi süsteemi järgi on „kategooriata kemikaal“, soovitatakse teha teine katse (kolme silmaga) selle negatiivse tulemuse kinnitamiseks või tagasilükkamiseks.

KATSE KÄIK

Silmade ettevalmistamine

Silmalaud lõigatakse hoolikalt ära, vältides sarvkesta vigastamist. Sarvkesta kvaliteeti kontrollitakse kiiresti ühe tilga 2 % (mass/ruumala) naatriumfluorestseiini lahusega, mis kantakse sarvkesta pinnale mõneks sekundiks ja loputatakse siis maha isotoonilise keedusoolalahusega. Fluorestseiiniga töödeldud silmi vaadeldakse seejärel biomikroskoobiga, et teha kindlaks, et sarvkest on vigastamata (st fluorestseiini peetumine ja sarvkesta hägususe hinne on $\leq$ 0,5).

Kui sarvkest on vigastamata, jätkatakse ettevaatlikult silma koljust eemaldamist, vältides sarvkesta vigastamist. Silmamuna tõmmatakse silmakoopast välja, hoides pilkkilet kindlalt kirurgitangidega, ja silmalihased lõigatakse läbi painutatud nüriotsaliste kääridega. Oluline on vältida sarvkesta vigastust liigse rõhu tõttu (st vältida tuleb kompressioonist tingitud artefakte).

Silma eemaldamisel silmakoopast tuleb silmamuna külge jätta nähtav osa silmanärvi. Kui silm on silmakoopast eemaldatud, pannakse see filterpaberile ning lõigatakse ära pilkkile ja muud sidekoelised osad.

Eemaldatud silm paigutatakse roostevabast terasest klambri vahele, nii et sarvkest on vertikaalasendis. Klamber pannakse seejärel superfusiooniaparaadi kambrisse (18). Klambrid tuleb superfusiooniaparaadis paigutada nii, et kogu sarvkesta niisutataks isotoonilise keedusoolalahusega (3-4 tilka/min või 0,1–0,15 ml/min). Superfusiooniaparaadi kambrite temperatuuri tuleb hoida 32 ± 1,5 °C. 3. liites on esitatud tüüpilise superfusiooniaparaadi ja silmaklambrite skeem; sellise aparaadi võib osta või valmistada ise. Aparaati võib muuta vastavalt konkreetse labori vajadustele (näiteks vajaliku arvu silmade paigutamiseks aparaati).

Pärast superfusiooniaparaati paigutamist kontrollitakse silmi uuesti biomikroskoobiga, et nende hulgas ei oleks prepareerimisega vigastatud silmi. Samal ajal mõõdetakse sarvkesta tipus sarvkesta paksus, kasutades biomikroskoobi sügavusmõõtmisseadet. Asendatakse kõik järgmiste tunnustega silmad: i) milles fluorestseiini peetumise hinne > 0,5; ii) mille sarvkesta hägusus > 0,5; või iii) millel on muid kahjustuse tunnuseid. Osutatud kriteeriumide põhjal katsest välja jätmata silmade hulgast kõrvaldatakse veel silmad, mille sarvkesta paksus erineb üle 10 % kõikide silmade kohta arvutatud keskväärtusest. Kasutajad peaksid arvestama, et pilu erineva laiuse korral võib biomikroskoobiga saada erinevaid sarvkesta paksuse väärtuse tulemusi. Pilu laiuseks tuleb seada 0,095 mm.

▼M7

Kui kõik silmad on üle vaadatud ja kõlblikuks tunnistatud, inkubeeritakse neid umbes 45–60 minutit, et need saavutaksid katsesüsteemiga tasakaalu, enne kui neile uuritav aine peale kantakse. Pärast tasakaalustumist mõõdetakse sarvkesta paksuse ja hägususe võrdlustase (0-tase), mis jääb lähtetasemeks (väärtused ajahetkel 0). Prepareerimise ajal määratud fluorestseiini peetumise hinnet kasutatakse kõnealuse näitaja lähtetaseme väärtusena.

Uuritava kemikaaliga töötlemine

Kohe pärast võrdlustaseme (0-taseme) mõõtmist võetakse silm (silmahoidikus) superfusiooniaparaadist välja, pannakse horisontaalasendisse ja uuritav kemikaal kantakse sarvkestale.

Vedelaid uuritavaid kemikaale testitakse tavaliselt lahjendamata, kuid neid võib ka lahjendada, kui seda peetakse vajalikuks (näiteks kui see on osa katse korraldusest). Eelistatud lahusti kemikaalide lahjendamiseks on füsioloogiline keedusoolalahus. Kontrollitud tingimustes võib kasutada ka muid lahusteid, kuid muude lahustite kui füsioloogilise keedusoolalahuse sobivust on vaja tõendada.

Vedelad uuritavad kemikaalid kantakse sarvkestale nii, et kogu sarvkesta pind on uuritava kemikaaliga ühtlaselt kaetud; tavaline ruumala on 0,03 ml.

Tahked uuritavad kemikaalid tuleks hõõruda võimalikult peeneks uhmris uhmrinuiaga või muu peenestamisvahendiga. Pulber kantakse sarvkestale niimoodi, et pind oleks uuritava kemikaaliga ühtlaselt kaetud; tavaline kogus on 0,03 g.

Uuritav (vedel või tahke) kemikaal kantakse 10 sekundiks peale ja loputatakse siis silma pealt maha toatemperatuuril oleva isotoonilise keedusoolalahusega (umbes 20 ml). Silm (silmahoidikus) pannakse seejärel tagasi superfusiooniaparaati esialgsesse vertikaalasendisse. Vajaduse korral võib kasutada täiendavat loputamist pärast 10-sekundilist pealekandmist ja ka hiljem (näiteks kui sarvkestal leitakse uuritava kemikaali jääke). Üldiselt ei ole loputamiseks kasutatud soolalahuse kogus otsustava tähtsusega, kuid oluline on jälgida, kas kemikaal on jäänud sarvkestale.

Kontrolli kemikaalid

Igas katses tuleks teha paralleelseid mõõtmisi ka negatiivse või lahusti/vehiikuli kontrolli ja positiivse kontrolli kemikaalidega.

100-protsendilise vedeliku või tahke aine uurimise korral kasutatakse ICE-katsemeetodis paralleelse negatiivse kontrollina füsioloogilist keedusoolalahust, et teha kindlaks katsesüsteemi mittespetsiifilisi muutusi ning tõendada, et katsetingimused ise ei tekita eksitavaid ärritusnähtusid.

Lahjendatud vedeliku uurimise korral tehakse ICE-katsemeetodiss paralleelselt lahusti/vehiikuli kontrolli rühm, et teha kindlaks katsesüsteemi mittespetsiifilisi muutusi ning tõendada, et katsetingimused ise ei tekita eksitavaid ärritusnähtusid. Nagu öeldud punktis 31, võib katses kasutada ainult sellist lahustit/vehiikulit, mille kohta on tõendatud, et see ei avalda kahjulikku toimet katsesüsteemile.

Igasse katsesse lisatakse positiivse kontrollina paralleelselt ka silmi teadaolevalt ärritav aine, et veenduda asjakohase tulemuse saamises. Kuna käesolevas katsemeetodis kasutatakse ICE-katsemeetodit söövitavate või tugevasti ärritavate kemikaalide kindlakstegemiseks, peaks positiivse kontrolli kemikaal olema selline võrdluskemikaal, mis selle katsemeetodi puhul põhjustab tugeva reaktsiooni. Selleks et oleks võimalik hinnata ka reaktsiooni positiivsele kontrollile ja selle

▼M7

muutumist ajas, ei tohiks raske reaktsioon olla ülemäära tugev. Positiivse kontrolli kohta tuleks saada piisaval hulgal *in vitro*-andmeid, et saaks arvutada positiivse kontrolli väärtuste statistiliselt määratletud sobiva vahemiku. Kui konkreetse positiivse kontrolli jaoks ei ole piisavalt varasemaid korralikke ICE-katse andmeid, võib selle teabe saamiseks olla vaja teha eraldi uuringuid.

Vedelate uuritavate kemikaalide positiivse kontrolli näited on 10 % äädikhape või 5 % bensalkooniumkloriid; tahkete uuritavate kemikaalide positiivse kontrolli näited on naatriumhüdroksiid või imidasool.

Võrdluskemikaalid võimaldavad hinnata teatavasse kemikaali- või tooteklassi kuuluva tundmatu kemikaali potentsiaali põhjustada silmade ärritust või hinnata silmi ärritava toimega konkreetse kemikaali potentsiaali ärritusreaktsiooni konkreetses vahemikus.

Mõõdetavad näitajad

Sarvkesti hinnatakse enne uuritava ainega töötlemist ning 30, 75, 120, 180 ja 240 minutit (± 5 minutit) pärast töötlemisjärgset loputamist. Nende mõõtmise ajapunktidega saadakse piisav arv mõõtmisi töötlemisele järgneva neljatunnilise ajavahemiku jooksul; samas jääb mõõtmiste vahele piisavalt aega, et nõutavad vaatlused tehtaks kõikide silmade puhul.

Mõõdetakse järgmisi näitajaid: sarvkesta hägusus, turse, fluorestseiini peetumine ja morfoloogilised muutused (näiteks epiteeli punktsöövitus või irdumine). Kõiki näitajaid peale fluorestseiini peetumise (mida määratakse ainult enne kokkupuudet kemikaaliga ja 30 minutit pärast kokkupuudet uuritava kemikaaliga) määratakse igal eespool osutatud vaatlusajal.

Sarvkesta hägusust, fluorestseiini peetumist, morfoloogilisi muutusi ja histopatoloogiat (kui seda uuritakse) on soovitatav dokumenteerida fotodega.

Pärast viimast vaatlust neljanda tunni järel on soovitatav säilitada silmad sobivas fiksaatoris (näiteks puhverdatud neutraalses formaliinis) võimaliku histopatoloogilise uuringu jaoks (vt täpsemalt punkt 14 ja viide 8).

Sarvkesta turse määratakse sarvkesta paksuse mõõtmisega, milleks kasutatakse biomikroskoobi optilist pahhümeetrit. Sarvkesta turse väljendatakse protsendina ja arvutatakse sarvkesta paksuse mõõtmisandmetest järgmise valemiga:

$$\left(\frac{\textit{sarvkesta paksus ajahetkel } t - \textit{sarvkesta paksus ajahetkel} = 0}{\textit{sarvkesta paksus ajahetkel} = 0} \right) \times 100$$

Arvutatakse kõikide katses kasutatud silmade keskmine sarvkesta turse protsent iga vaatlusaja jaoks. Igal vaatlusajal registreeritud sarvkesta turse kõige suurema keskmise hinde põhjal määratakse iga uuritava kemikaali üldine kategooriahinne (vt punkt 51).

Sarvkesta hägususe hindamiseks kasutatakse kõige rohkem hägustunud sarvkestaosa pindala, nagu on näidatud tabelis 1. Arvutatakse kõikide katses kasutatud silmade keskmine sarvkesta hägususe väärtus iga vaatlusaja jaoks. Igal vaatlusajal registreeritud sarvkesta hägususe kõige suurema keskmise hinde põhjal määratakse iga uuritava kemikaali üldine kategooriahinne (vt punkt 51).

▼M7

Tabel 1

Sarvkesta hägususe hinne punktides

Hinne punktides	Täheldatud nähud
0	hägusust ei ole
0,5	väga nõrk hägusus
1	hajutatud või difuussed hägususalad; vikerkesta detailid on selgelt nähtavad
2	kergesti märgatav läbipaistev ala; vikerkesta detailid on veidi ebaselged
3	sarvkest on tugevalt hägune; vikerkesta konkreetsed detailid ei ole nähtavad; pupilli suurus on vaevueristuv
4	sarvkest on täielikult hägune; vikerkesta ei ole näha

Fluorestseiini peetumist hinnatakse ainult ajahetkel 30 minutit pärast kokkupuudet, nagu on näidatud tabelis 2. Keskmine fluorestseiini peetumise väärtus arvutatakse seejärel kõikide katses kasutatavate silmade jaoks ainult ajahetke 30 minutit jaoks; osutatud väärtust kasutatakse igale uuritavale kemikaalile üldise kategooriahinde omistamisel (vt punkt 51).

Tabel 2

Fluorestseiini peetumise hinne punktides

Hinne punktides	Täheldatud nähud
0	fluorestseiini peetumist ei ole
0,5	üksikud rakud on väga nõrgalt värvunud
1	üksikuid värvunud rakke on hajusalt kogu töödeldud sarvkesta alal
2	värvunud üksikrakkude kolded või tihedalt laatunud alad
3	peetunud fluorestseiiniga sarvkestaalad moodustavad ulatuslikke laatunud laike

Morfoloogiline mõju hõlmab järgmist: sarvkesta epiteelirakkude „punktsöövitus“, epiteeli irdumine, sarvkesta pinna karestumine ning uuritava aine „kleepumine“ sarvkestale. Sellised nähud võivad olla erineva raskusastmega ja esineda samaaegselt. Nende nähtude klassifitseerimine on subjektiivne ja sõltub uurija tõlgendusest.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete hindamine

Sarvkesta hägususe ja turse ning fluorestseiini peetumise tulemusi tuleb hinnata eraldi, et leida ICE-klass iga näitaja jaoks. Iga näitaja ICE-klassid koondatakse seejärel iga uuritava kemikaali puhul ärritava toime klassifikatsiooni saamiseks.

Otsustamiskriteeriumid

Kui iga näitaja on hinnatud, saab eelnevalt määratud vahemiku alusel määrata ICE-klassid. Sarvkesta turse (tabel 3), hägususe (tabel 4) ja fluorestseiini peetumise (tabel 5) tõlgendamine nelja ICE-klassi kasutamisega toimub järgmiste skaalaastmete alusel. Oluline on märkida, et sarvkesta turse hindeid tabelis 3 saab kasutada ainult siis, kui sarvkesta paksus on mõõdetud biomikroskoobiga

▼M7

(näiteks Haag-Streit BP 900), kasutades sügavusmõõtmisseadet nr 1 ja pilulaiust $9\frac{1}{2}$, mis võrdub 0,095 mm-ga. Kasutajad peavad arvestama, et biomikroskoobiga võib erineva pilulaiuse korral saada sarvkesta paksuse erineva väärtuse.

Tabel 3

Sarvkesta turse ICE-klassifitseerimise kriteeriumid

Keskmine sarvkesta turse (%) (*)	ICE-klass
0 kuni 5	I
> 5 kuni 12	II
> 12 kuni 18 (> 75 minutit pärast töötlemist)	II
> 12 kuni 18 (≤ 75 minutit pärast töötlemist)	III
> 18 kuni 26	III
> 26 kuni 32 (> 75 minutit pärast töötlemist)	III
> 26 kuni 32 (≤ 75 minutit pärast töötlemist)	IV
> 32	IV

(*) Suurim registreeritud keskmine väärtus kõikidel vaatlusaegadel

Tabel 4

Sarvkesta hägususe ICE-klassifitseerimise kriteeriumid

Maksimaalne keskmise hägususe hinne (*)	ICE-klass
0,0 kuni 0,5	I
0,6 kuni 1,5	II
1,6 kuni 2,5	III
2,6 kuni 4,0	IV

(*) Maksimaalsed kõikidel vaatlusaegadel registreeritud hägususe väärtuse keskmised hinded (põhinevad tabelis 1 esitatud hägususe hindepunktide põhjal).

Tabel 5

Fluorestseiini peetumise ICE-klassifitseerimise kriteeriumid

Keskmine fluorestseiini peetumise hinne 30 minutit pärast töötlust (*)	ICE-klass
0,0 kuni 0,5	I
0,6 kuni 1,5	II
1,6 kuni 2,5	III
2,6 kuni 3,0	IV

(*) Põhineb tabelis 2 määratletud hinnetel.

Uuritava kemikaali *in vitro* klassifikatsioon hinnatakse GHSi klassifikatsioooni järgi; selle leidmiseks ühendatakse kategooriad, mis on saadud sarvkesta turse, sarvkesta hägususe ja fluorestseiini peetumise järgi, nagu on kirjeldatud tabelis 6.

▼M7

Tabel 6

Ühendatud *in vitro* klassifikatsioon

ÜRO GHSi klassifikatsioon	Kolme näitaja kombinatsioonid
Kategooriata	3 × I 2 × I, 1 × II
Prognoosi ei saa teha	Muud kombinatsioonid
1. kategooria	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) 30 minuti pärast sarvkesta hägusus ≥ 3 (vähemalt kahes silmas) mis tahes vaatlusajal sarvkesta hägusus = 4 (vähemalt kahes silmas) Epiteeli tugev irdumine (vähemalt ühes silmas)

(*) Ebatõenäolisemad kombinatsioonid

Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid

Katse loetakse nõuetekohaseks, kui paralleelne negatiivne kontroll või vehiikuli/lahusti kontrollid on kindlaks tehtud kui GHSi kategooriata ained ning paralleelsed positiivsed kontrollid on määratud kui GHSi 1. kategooria.

Katseprotokoll

Katseprotokollis tuleb esitada järgmine teave, kui see on uuringu läbiviimise seisukohast asjakohane:

Uuritav kemikaal ja kontrolli kemikaalid

— keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu struktuurikohane nimetus, mida kasutab Chemical Abstracts Service (CAS), seejärel muud nimetused, kui need on teada;

— CASi registreerimisnumber, kui on teada;

— uuritava kemikaali ja kontrolli kemikaalide puhtus või segu koostis (massiprotsendina), teadaolevas ulatuses;

— füüsikalis-keemilised omadused nagu füüsikaline olek, lenduvus, pH, stabiilsus, kemikaaliklass, lahustuvus vees, mis on olulised katse läbiviimise seisukohast;

— uuritava kemikaali / kontrolli kemikaali töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

— stabiilsus, kui on teada.

Teave sponsori ja uurimisasutuse kohta

— sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

— silmade päritolu kirjeldus (näiteks asutus, kust need saadi);

Katsemeetodi tingimused

— kasutatud katsesüsteemi kirjeldus;

▼M7

— kasutatud biomikroskoop (näiteks mudel) ja kasutatud biomikroskoobi seaded;

— viide varasematele negatiivse ja positiivse kontrolli tulemustele ja, kui see on asjakohane, varasematele andmetele, mis tõendavad, et paralleelsete võrdluskontrollide tulemuste vahemikud on vastuvõetavad;

— meetodid, mida kasutati katsemeetodi tervikluse (st täpsuse ja usaldusväärsuse) tagamiseks ajas (nt perioodiline testimine pädevuse kontrolli kemikaalidega).

Silmade hankimine ja ettevalmistamine

— doonorloomade, kellelt silmad eemaldati, vanus ja mass, ning kättesaadavuse korral muud eriomadused (nt sugu, tõug);

— silmade säilitamise ja transpordi tingimused (näiteks silmade võtmise aeg, ajavahemik kanapeade eemaldamisest kuni neist eemaldatud silmade superfusiooni kambrisse panekuni);

— silmade prepareerimine ja hoidikusse paigaldamine, seejuures nende kvaliteetsus, silmahoidikukambri temperatuur ja valikukriteeriumid, mida kasutati silmade katsesse valimiseks.

Katse käik

— paralleelide arv;

— kasutatud negatiivse ja positiivse kontrolli kemikaalid (vajaduse korral ka lahusti ja võrdluskemikaalid);

— uuritava kemikaali doos, kasutatud pealekandmisviis ja kokkupuuteaeg;

— vaatluste ajapunktid (enne ja pärast töötlemist);

— kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;

— kasutatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kirjeldus;

— kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus.

Tulemused

— tabelitena sarvkesta turse, hägususe ja fluorestseiini peetumise hinded, mis on saadud iga silma kohta eraldi ja igal vaatlusajal, sealhulgas iga vaatlusaja keskmised tulemused kõigi katses kasutatud silmade kohta;

— sarvkesta turse, hägususe ja fluorestseiini peetumise kõige suurem keskmine hinne (mis tahes vaatlusajal) ja selle vastav ICE-klass;

— mis tahes muude täheldatud toimete kirjeldus;

— *in vitro* määratud GHSi klassifikatsioon;

— vajaduse korral silmade fotod.

Tulemuste arutelu

Kokkuvõte

▼**M7**

KIRJANDUS

(1) ICCVAM (2007). *Test Method Evaluation Report* – In Vitro *Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives*. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) ja the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Kättesaadav aadressil: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ESAC (2007). *Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic* in vitro *assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants*. Kättesaadav aadressil: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(3) ICCVAM (2010). *ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of* in vitro *Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method*. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) ja the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Kättesaadav aadressil: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(4) United Nations (UN) (2011). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Kättesaadav aadressil: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) *Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion*. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

(6) Käesoleva lisa peatükk B.5 „Äge mürgisus: silmade ärritus/söövitus“.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). „A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches“. *Toxicology in Vitro* 24, 1–9.

(8) OECD (2011) „Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants“. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

(9) ICCVAM. (2006). Background review document: „Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method“. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Kättesaadav aadressil: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). „Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits“. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69–76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009), *Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test*, 13pp. Kättesaadav aadressil: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995), „The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test“. *Toxicol. In Vitro* 9:871–929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). „The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials“. *Food Chem. Toxicol*. 34:291–296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: „Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation“. *Food Chem. Toxicol.* 35:23–37.

(15) Prinsen, M.K. (2006). „The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage?“ *Toxicology in Vitro* 20, 78–81.

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). „Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings“. Kättesaadav aadressil: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). „Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays“. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106–117.

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). „The *in vitro* assessment of severe irritants“. *Fd. Cosmet.- Toxicol.* 19, 471–480.

▼M7

1. liide

MÕISTED

Aine – looduslikud või mis tahes meetodi abil toodetud keemilised elemendid ja nende ühendid, mis võivad sisaldada toote stabiliseerimiseks vajalikke lisaaineid või tootmismeetodist tingitud lisandeid, kuid ei tohi sisaldada ühtki lahustit, mida on võimalik kemikaali stabiilsust vähendamata ja selle koostist muutmata eraldada (4);

Alt-üles lähenemisviis – astmeline lähenemisviis, kasutatakse kemikaali puhul, mille kohta võib oletada, et seda ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega; alustatakse klassifitseerimist mitte vajavate kemikaalide (negatiivne tulemus) eraldamisega muudest kemikaalidest (positiivne tulemus).

Astmelise katsetamise strateegia – etapiviisi katsetamise strateegia, milles enne järgmise etapiga alustamist vaadatakse uuritava kemikaali kohta kindlaksmääratud korras läbi kogu olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse analüüsi, et otsustada, kas teave on piisav ohuklassi määramiseks. Kui olemasoleva teabe põhjal saab uuritava kemikaali ärritava toime potentsiaali kohta otsuse teha, ei ole edasisi katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa otsustada uuritava kemikaali ärritava toime potentsiaali üle, jätkatakse järjestikuste loomkatsete etapiti tegemist, kuni kemikaali saab üheselt klassifitseerida.

Biomikroskoop – seade, mida kasutatakse silma vahetuks uurimiseks- binokulaarmikroskoobiga, mille abil saadakse suurendatud vertikaalne stereoskoopiline kujutis. ICE-katses kasutatakse seda seadet kanasilma eesmiste struktuuride vaatlemiseks, samuti sarvkesta paksuse objektiivseks mõõtmiseks, kasutades lisaseadet – pahhümeetrit.

Fluorestseiini peetumine – ICE-katses subjektiivselt hinnatav suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava ainega sarvkesta epiteelirakkudes peetunud naatriumfluorestseiini määra. Fluorestseiini peetumise määr näitab sarvkesta epiteeli kahjustuse suurust.

Kemikaal – aine või segu.

Klassifitseerimata – kemikaalid, mida ei klassifitseerita seoses silmaärritusega (ÜRO GHSi 2. kategooria) või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi 1. kategooria). Samatähenduslik mõistega „ÜRO GHSi kategooriata“.

Lahusti/vehiikuli kontroll – uuritava kemikaaliga töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või vehiikulit; sellist proovi töödeldakse samamoodi uuritava kemikaaliga töödeldud proovidele ja muudele kontrolli proovidele, et määrata kindlaks samas lahustis või vehiikulis lahustatud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide tekitatud reaktsiooni lähtetase. Kui paralleelselt uuritakse negatiivse kontrolli proovi, siis näitab lahusti/vehiikuli proov ka seda, kas lahusti või vehiikul reageerib katsesüsteemiga.

Negatiivne kontroll – uuritava ainega töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Sellist proovi töödeldakse koos proovidega, mida mõjutatakse uuritava kemikaaliga, ja koos muude kontrolli proovidega, et kontrollida, kas lahusti reageerib katsesüsteemiga.

Ohtlikkus – mõjuri või olukorra iseloomulik omadus, millel võib olla kahjulik toime, kui organism, süsteem või (ala-)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Pindaktiivne aine – see on aine, näiteks detergent, mis võib vähendada vedeliku pindpinevust ja võimaldab sellel vahutada või tungida tahketesse ainetesse; sama mis märgav aine.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida töödeldakse kemikaaliga, mis teadaolevalt põhjustab positiivse tulemuse. Selleks et oleks võimalik hinnata ka reaktsiooni positiivse kontrolli ainele ja selle muutumist ajas, ei tohiks raske reaktsioon olla ülemäära tugev.

Pöördumatu toime silmale – vt „raske silmakahjustus“ ja „ÜRO GHSi 1. kategooria“.

▼M7

Pöörduv toime silmale – vt „raske silmakahjustus“ ja „ÜRO GHSi 2. kategooria“.

Raske silmakahjustus – koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat kemikaali on kantud silma eespoolsele pinnale ja mõju ei ole täielikult pöörduv 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist. Samatähenduslik mõistetega „Pöördumatu mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi 1. kategooria“ (4).

Sarvkest – silmamuna eesmise osa läbipaistev kest, mis katab vikerkesta ja pupilli ning laseb valgusel tungida silma sisse.

Sarvkesta hägusus – suurus, millega väljendatakse pärast kokkupuudet uuritava kemikaaliga toimunud sarvkesta hägustumise ulatust. Sarvkesta suurenenud hägusus näitab sarvkesta kahjustust.

Sarvkesta turse – ICE-katses objektiivselt mõõdetav suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava kemikaaliga tekkinud tursumuse ulatust. See väljendatakse protsendina ja arvutatakse ICE-katses enne töötlemist mõõdetud sarvkesta paksuse lähtetaseme ja pärast uuritava kemikaaliga kokkupuudet korrapäraste ajavahemike järel mõõdetud sarvkesta paksuse andmetest. Sarvkesta turse raskusaste näitab sarvkesta kahjustuse suurust.

Segu – segu või lahus, mis koosneb kahest või enamast ainest, mis omavahel ei reageeri (4).

Silmade ärritus – selliste muutuste tekkimine silmas pärast seda, kui uuritavat kemikaali on manustatud silma eespinnale, mis on täielikult pöörduvad 21 päeva jooksul pärast manustamist. Mõiste on samatähenduslik mõistetega „Pöörduv mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi 2. kategooria“ (4).

Tõendusmaterjali kaalukuse hindamine – protsess, milles kaalutakse mitmesuguste andmete tugevaid ja nõrku külgi, et jõuda otsuseni kemikaali võimaliku ohtlikkuse kohta ja toetada sellist otsust.

Täpsus – katsemeetodi tulemuste lähedus kokkulangemisele kinnitatud võrdlusväärtustega. Täpsusega mõõdetakse katsemeetodi toimivust ja see on üks asjakohasuse aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka kordustäpsuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse.

Usaldusväärsus – katsemeetodiga aja jooksul saadud tulemuste laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ulatuse mõõt, kui katset tehakse sama katse-eeskirja alusel. Seda hinnatakse laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ja laborisisese korduvuse arvutamisega.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M7

Valenegatiivsete tulemuste määr – kõikide selliste positiivsete kemikaalide osakaal, mis on katsemeetodi alusel ekslikult tunnistatud negatiivseks. See on katsemeetodi toimivuse üks näitajaid.

Valepositiivsete tulemuste määr – kõikide selliste negatiivsete kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud positiivseks. See on katsemeetodi toimivuse üks näitajaid.

Valideeritud katsemeetod – katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi suhtes. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse poolest, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi saavutamise seisukohast.

Võrdluskemikaal – kemikaal, mida kasutatakse uuritava kemikaali võrdlusstandardina. Võrdluskemikaalil peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritavate kemikaalidega; iii) teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused; iv) teadaolevaid toimeid tõendavad andmed; ja v) teadaolev tugevus soovitavas vastusreaktsiooni vahemikus.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS (*Globally Harmonized System*)) – süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (4).

Ülalt-alla lähenemisviis – astmeline lähenemisviis, kasutatakse kemikaali puhul, mille kohta võib oletada, et see tekitab rasket silmakahjustust; alustatakse rasket silmakahjustust tekitavate kemikaalide (positiivne tulemus) eraldamisega muudest kemikaalidest (negatiivne tulemus).

ÜRO GHSi 1. kategooria – vt „raske silmakahjustus“ ja/või „pöördumatu mõju silmale“.

ÜRO GHSi 2. kategooria – vt „silmaärritus“ ja/või „pöörduv mõju silmale“.

ÜRO GHSi kategooriata – kemikaalid, mis ei vasta ÜRO GHSi 1. kategooria või 2. (2A või 2B) kategooria nõuetele. Sama mis „klassifitseerimata“.

▼M7

2. liide

ICE-KATSEMEETODI PÄDEVUSE KONTROLLI KEMIKAALID

Enne käesoleval katsemeetodil põhineva määramise tavakasutusse võtmist peaks labor tõendama tehnilist pädevust ja selleks õigesti klassifitseerima tabelis 1 soovitatud 13 silmadele ohtlikku kemikaali. Kõnealused kemikaalid on valitud nii, et need esindavad silma ohutegurite põhjustatud reaktsioonide vahemikku, mis põhineb küüliku silma *in vivo* katse (katsemeetod 405) ja ÜRO GHSi klassifitseerimise süsteemi (see tähendab ÜRO GHSi 1. kategooria, 2A või 2B kategooria või klassifitseerimata) tulemustel (4, 6). Peale selle arvestati kemikaalide valimisel järgmisi kriteeriume: kaubanduslik kättesaadavus, kvaliteetsete *in vivo* võrdlusandmete olemasolu ja ICE-katsega saadud kvaliteetsete *in vitro* andmete olemasolu. Võrdlusandmed on esitatud lihtsustatud kokkuvõttedokumendis (5) ja ICCVAMi taustaülevaates ICE-meetodi kasutamise kohta (9).

Tabel 1

Soovitatavad tehnilise pädevuse tõendamise kemikaalid ICE-meetodi jaoks

Kemikaal	CASi nr	Kemikaaliklass ([1])	Füüsikaline olek	*In vivo*-klassifikatsioon ([2])	*In vitro* klassifikatsioon ([3])
bensalkooniumkloriid (5 %)	8001-54-5	ooniumühend	vedelik	1. kategooria	1. kategooria
kloorheksidiin	55-56-1	amiin, amidiin	tahke	1. kategooria	1. kategooria
dibensoüül-L-viinhape	2743-38-6	karboksüülhape, ester	tahke	1. kategooria	1. kategooria
imidasool	288-32-4	heterotsükkel	tahke	1. kategooria	1. kategooria
trikloroäädikhape (30 %)	76-03-9	karboksüülhape	vedelik	1. kategooria	1. kategooria
2,6-diklorobensoüülkloriid	4659-45-4	atsüülhaliid	vedelik	2A kategooria	ei ole võimalik prognoosida ([4])
ammooniumnitraat	6484-52-2	anorgaaniline sool	tahke	2A kategooria ([5])	ei ole võimalik prognoosida ([4])
etüül-2-metüülatseto-atsetaat	609-14-3	ketoon, ester	vedelik	2 B kategooria	ei ole võimalik prognoosida ([4])
dimetüülsulfoksiid	67-68-5	orgaaniline väävliühend	vedelik	kategooriata	kategooriata
glütserool	56-81-5	alkohol	vedelik	kategooriata	kategooriata (piiripealne)
metüültsüklopentaan	96-37-7	süsivesinik (tsükliline)	vedelik	kategooriata	kategooriata
n-heksaan	110-54-3	süsivesinik (atsükliline)	vedelik	kategooriata	kategooriata

▼**M7**

Kemikaal	CASi nr	Kemikaaliklass (1)	Füüsikaline olek	*In vivo*-klassifikatsioon (2)	*In vitro* klassifikatsioon (3)
triatsetiin	102-76-1	lipiid	vedelik	klassifitseerimata	kategooriata

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number.

(1) Kemikaaliklass on igale uuritavale ainele omistatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniraamatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimise süsteemil (vt http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Põhineb küüliku *in vivo* silmakatse (OECD katsejuhend nr 405) tulemustel ning selles kasutatakse ÜRO GHSi (4, 6).

(3) Põhineb tabelis 6 esitatud ICE-tulemustel

(4) Muude kui tabelis 6 kirjeldatud ICE tulemuste kombinatsioonid „GHSi kategooriata“ ja „GHSi 1. kategooria“ (vt tabel 6).

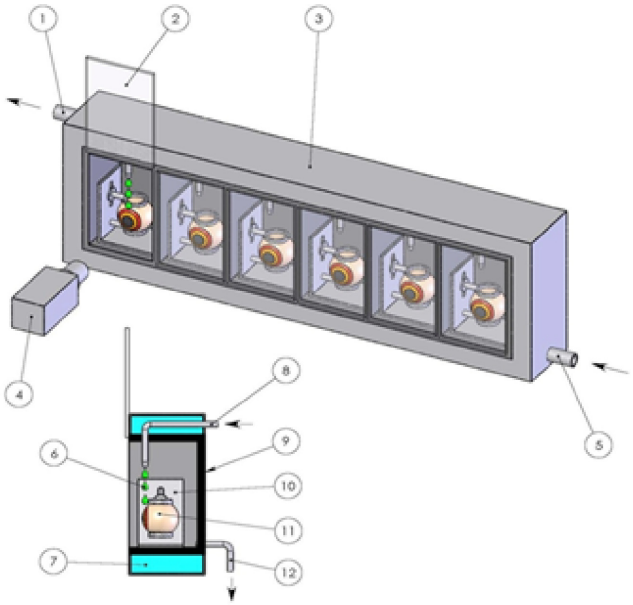
(5) Klassifitseerimine 2A või 2B kategooriasse sõltub ÜRO GHSi kriteeriumi tõlgendusest, mille alusel eristatakse neid kahte kategooriat, st üks kolmest või kaks kolmest loomast, kellel 7. päeval avaldub veel mõju, on vajalik(ud) selleks, et klassifitseerida kemikaal 2A kategooriasse. *In vivo* uuringus kasutati kolme looma. Kõik näitajad peale sidekesta punetuse ühel loomal paranesid hindeni 0 seitsmendaks päevaks või varem. Ühel loomal, kes ei paranenud täielikult 7. päevaks, oli 7. päeval sidekesta punetuse hinne 1, kuid sidekest oli täielikult paranenud 10. päevaks.

▼M7

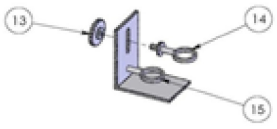
3. liide

ICE-KATSES KASUTATAVA SUPERFUSIOONIPARAADI JA SILMAHOIDIKU SKEEM

(Vt superfusiooniaparaadi ja silmaklambri täiendav üldine kirjeldus, Burton jt (18).)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Punkt nr	Kirjeldus	Punkt nr	Kirjeldus
1	Sooja vee väljalasketoru	9	Kamber
2	Lükanduks	10	Silmahoidik
3	Superfusiooniaparaat	11	Kanasilm
4	Optilise mõõtmise seade	12	Soolalahuse väljalasketoru
5	Sooja vee sisselasketoru	13	Fikseerimiskruvi
6	Soolalahus	14	Reguleeritav ülemine hoidik
7	Soe vesi	15	Fikseeritud alumine hoidik
8	Soolalahuse sisselasketoru		

▼M7

B.49. **MIKROTUUMADE TEKKE *IN VITRO* KATSE IMETAJARAKKUDEGA**

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 487 (2016). See on osa geneetilise toksikoloogia katsemeetodite sarjast Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

Mikrotuumade tekke *in vitro* katse on genotoksilisuse katse, milles määratakse mikrotuumade esinemist interfaasis olevate rakkude tsütoplasmas. Mikrotuumad võivad tekkida atsentrilistest kromosoomifragmentidest (st tsentromeerita fragmendid) või tervetest kromosoomidest, mis ei suuda liikuda poolustele raku jagunemise anafaasi etapis. Seega on mikrotuumade katse *in vitro* meetod, mis võimaldab *in vitro* terviklikult uurida kromosoomide kahjustamise potentsiaali, sest sellega saab määrata nii aneugeene kui ka klastogeene (2, 3) rakkudes, mis on jagunenud pärast kemikaaliga kokkupuudet või selle ajal (vt üksikasjalikumalt punkt 13). Mikrotuumad on tütarrakkudesse edasi kanduv kahjustus, samal ajal kui metafaasis olevates rakkudes sedastatavad kromosoomaberratsioonid tütarrakkudesse ei kandu. Mõlemal juhul võivad muutused olla raku elutegevusega kokkusobimatud.

Käesolev katsemeetod võimaldab kasutada nii selliseid metoodikaid, milles kasutatakse aktiini polümerisatsiooni inhibiitorit tsütohalasiin B (*cytochalasin B*, *cytoB*), kui ka selliseid, milles seda ei kasutata. *CytoB* lisamine enne mitoosi põhjustab kahetuumaliste rakkude teket ning võimaldab seega mikrotuumi määrata ja analüüsida vaid nendes rakkudes, mis on ühe mitoosi täielikult lõpetanud (4, 5). Käesolev katsemeetod võimaldab kasutada ka ilma tsütokineesi blokeerimiseta katsemetoodikaid, kui on tõendatav, et analüüsitav rakupopulatsioon on läbinud mitoosi.

Lisaks sellele, et kasutada mikrotuumade tekke *in vitro* katset mikrotuumade teket indutseerivate kemikaalide kindlaks tegemiseks, võib kinetohooride immunokeemilise märgistamise või tsentromeeri/telomeeri piirkonna proovidega hübriidimise kaudu (*in situ* fluorestsentshübriidimine, FISH) saada lisateavet kromosoomikahjustuse ja mikrotuumade tekke mehhanismide kohta (6–17). Märgistamise ja hübriidimise meetodeid võib kasutada, kui mikrotuumade teke on suurenenud ning uurija tahab kindlaks teha, kas nende suurenenud tekke põhjus on klastogeenne ja/või aneugeenne protsess.

Kuna interfaasis olevates rakkudes saab mikrotuumi hinnata suhteliselt objektiivselt, piisab, kui laboripersonal määrab *cytoB* kasutamise korral kahe tuumaga rakkude arvu ning kõigil juhtudel mikrotuumadega rakkude esinemuse. Seepärast saab mikroskoobipreparaate hinnata suhteliselt kiiresti ja analüüsi saab automatiseerida. Seepärast on asjakohane iga töötlemise kohta hinnata sadade rakkude asemel tuhandeid rakke; see suurendab katse statistilist võimsust. Peale selle, kuna mikrotuumad võivad tekkida kromosoomiloive tõttu, on võimalik tuvastada aneuploidsust põhjustavaid kemikaale, mida on keeruline kindlaks teha tavaliste kromosoomaberratsioonkatsetega, nt käesoleva lisa peatükk B.10 (18). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud mikrotuumade tekke *in vitro* katse ei võimalda siiski ilma punktis 4 nimetatud erimeetoditeta (nt FISH), eristada kemikaale, mis põhjustavad kromosoomiarvu ja/või ploidsuse muutusi, klastogeensust tekitavatest kemikaalidest.

Mikrotuumade tekke *in vitro* katse on töökindel ning teostatav paljude rakutüüpidega, nii *cytoB* manulusel kui ka selleta. Väga paljud andmed toetavad mikrotuumade tekke *in vitro* katse kasutatavust eri rakutüüpide puhul (rakuliinid või primaarkultuurid) (19–36). Need hõlmavad eelkõige rahvusvahelisi valideerimisuuringuid, mida koordineeris *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (19–23), ja genotoksilisuse uuringuid käsitleval rahvusvahelisel seminaril

▼M7

International Workshop on Genotoxicity Testing esitatud materjale (5, 17). Euroopa Alternatiivsete Meetodite Tõestamise Keskus (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) on tõendite kaalukusel põhineva retrospektiivse valideerimisuuringuga olemasolevaid andmeid ka uuesti hinnanud ning katsemeetodi teaduslikku usaldusväärsust on kinnitanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC) (37–39).

Mikrotuumade tekke *in vitro* katses võib kasutada inimese või näriliste rakuliine või primaarseid rakukultuure. Kuna mikrotuumade foonis esinemise sagedus mõjutab katse tundlikkust, soovitatakse kasutada rakutüüpe, mille puhul mikrotuumade tekke sagedus foonis on stabiilne ja kindlaks määratud. Kasutatavad rakud valitakse rakukultuuris hea kasvuvõime, karüotüübi (sealhulgas kromosoomiarvu) stabiilsuse ja mikrotuumade spontaanse esinemissageduse alusel (40). Praegu olemasolevad andmed ei võimalda anda kindlaid soovitusi, kuid nende alusel võib eeldada, et keemiliste ohutegurite hindamisel on oluline võtta arvesse katseks valitud rakkude *p53* staatust, geneetilist (karüotüübi) stabiilsust, DNA reparatsiooni võimet ja päritolu (näriliste või inimese rakud). Seega soovitatakse käesoleva katsemeetodi kasutajatel indutseeritud mikrotuumade tekke määramiseks võtta arvesse neid ja – valdkonna teadmiste lisandumisel – muid rakuliini toimimist mõjutavaid rakulisi näitajaid.

Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

In vitro katsete puhul tuleb üldjuhul kasutada eksogeenset metaboolse aktivatsiooni allikat, välja arvatud juhul, kui rakud metaboliseerivad uuritavaid kemikaale. Eksogeenne metaboolse aktivatsiooni süsteem ei ole täielikult samastatav *in vivo* tingimustega. Hoolikalt tuleb vältida tingimusi, mis võivad põhjustada valepositiivseid tulemusi, mis ei peegelda uuritavate kemikaalide genotoksilisust. Sellised tingimused hõlmavad pH (41–43) või osmolaalsuse muutusi, söötme koostisosadega reageerimist (44, 45) või liiga suurt tsütotoksilisust (vt punkt 29).

Mikrotuumade tekke induktsiooni analüüsimiseks on väga tähtis, et mitoos oleks toimunud nii uuritava kemikaaliga töödeldud kultuurides kui ka töötlemata kultuurides. Mikrotuumade hindamiseks on kõige informatiivsemad sellises faasis rakud, mis on uuritava kemikaaliga töötlemise ajal või pärast seda läbinud täielikult ühe mitoosi. Tehislike nanomaterjalide uurimiseks on käesolevat katsemeetodit vaja eraldi kohandada, kuid seda ei ole käesolevas katsemeetodis kirjeldatud.

Enne kui kasutada seda meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

KATSE PÕHIMÕTE

Inimrakkude või muud päritolu imetajarakkude kultuurid lastakse uuritava kemikaaliga kokku puutuda nii metaboolse aktivatsiooni eksogeense allika juuresolekul kui ka ilma selleta, välja arvatud juhul, kui kasutatakse piisava metaboliseerimisvõimega rakke (vt punkt 19).

Uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal või pärast seda kasvatatakse rakke piisava ajavahemiku jooksul, et interfaasis olevates rakkudes saaksid kromosoomikahjustuse või muude toimete tõttu rakutsükli/rakujagunemise protsessidele tekkida mikrotuumad. Aneuploidsuse põhjustamiseks peaks kokkupuude uuritava kemikaaliga tavaliselt toimuma mitoosi ajal. Kogutud ja värvitud interfaasirakke uuritakse mikrotuumade esinemise suhtes. Ideaaljuhul tuleks mikrotuumi hinnata üksnes sellistes rakkudes, mis on täielikult läbinud mitoosi kas uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal või kokkupuutejärgses perioodis, kui seda kasutatakse. Tsütokineesi blokaatoriga töödeldud kultuurides saavutatakse see lihtsalt, selleks hinnatakse vaid kahetuumalisi rakke. Tsütokineesi blokaatori puudumisel on

▼M7

tähtis tõendada, et analüüsitavad rakud on tõenäoliselt jagunenud; seejuures toetutakse rakupopulatsiooni suurenemisele uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal või pärast seda. Kõigi katsemetoodikate puhul on oluline tõendada, et rakkude paljunemine on toimunud nii kontrolli kultuurides kui ka töödeldud kultuurides, ning tuleb hinnata uuritava kemikaali põhjustatud tsütotoksilisuse või tsütostaasi ulatust kõigis kultuurides, mida hinnatakse mikrotuumade esinemise suhtes.

MEETODI KIRJELDUS

Rakud

Kasutada võib rakukultuuris kasvatatud primaarseid inimese või muude imetajate perifeerse vere lümfotsüüte (7, 20, 46, 47) ja mitmeid näriliste rakuliine, nt CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y, või inimese rakuliine, nt TK6 (19–23, 26–29, 31, 33–36) (vt punkt 6). Mikrotuumade tekke katses on kasutatud ka muid rakuliine, nagu HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50, 51), HepG2 rakud (52) (53), A549 ja süüria hamstri primaarseid embrüorakke (54), kuid nendega saadud andmeid ei ole praegu põhjalikult valideeritud. Seepärast tuleb muude rakuliinide ja -tüüpide kasutamist põhjendada nendega saadud tõendatud katsetulemuste põhjal, nagu on kirjeldatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide punktis. *CytoB* kohta on teatatud, et see võib mõjutada L5178Y rakkude kasvu, ning seetõttu ei soovitata selle kasutamist nimetatud rakuliiniga (23). Kui kasutatakse primaarseid rakke, tuleb loomade heaolu huvides kaaluda inimrakkude kasutamist kõigil juhtudel, kui rakkude saamine ei tekita probleeme ja proovid võetakse kooskõlas inimuuringute eetika põhimõtete ja nõuetega.

Inimese perifeerse vere lümfotsüüte tuleks võtta noortelt (umbes 18–35aastastelt) mittesuitsetavatelt isikutelt, kellel ei ole teadaolevaid haigusi ning kes ei ole hiljuti kokku puutunud genotoksiliste teguritega (nt kemikaalid, ioniseeriv kiirgus) koguses, mis võiks suurendada mikrotuumadega rakkude esinemist katse foonis. See tagaks, et mikrotuumadega rakkude esinemus foonis on väike ja püsiv. Mikrotuumadega rakkude esinemissageduse lähtetase suureneb vanusega ja see trend on rohkem väljendunud naistel kui meestel (55). Kui eri doonoritelt kogutud rakud kasutamiseks ühendatakse, tuleb esitada doonorite arv. On vaja tõendada, et rakud on pärast uuritava kemikaaliga töötlemise alustamist kuni proovi võtmiseni jagunenud. Rakukultuure hoitakse eksponentsiaalse kasvu faasis (rakuliinid) või stimuleeritakse rakkude jagunemist (lümfotsüütide primaarkultuurid), et saada rakke rakutsükli eri faasidest, sest eri faasides olevate rakkude tundlikkus uuritavate kemikaalide suhtes võib olla teadmata. Primaarsed rakud, mida tuleb jagunemiseks stimuleerida mitogeenidega, ei ole uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal tavaliselt enam sünkroniseeritud (nt inimese lümfotsüüdid pärast 48tunnist stimulatsiooni mitogeeniga). Uuritava kemikaaliga töötluse ajal ei soovitata sünkroniseeritud rakkude kasutamist, kuid see võib olla aktsepteeritav, kui on põhjendatud.

Söötmed ja kultiveerimistingimused

Rakukultuuride jaoks tuleb kasutada asjakohast söödet ja asjakohaseid inkubeerimistingimusi (kasvunõud, sobiva niiskusesisaldusega 5 % CO_2 atmosfäär (kui asjakohane), temperatuur 37 °C). Rakuliine tuleb tavapraktika korras kontrollida modaalse kromosoomiarvu stabiilsuse ja mükoplasmaga saastumise puudumise suhtes, ning saastunud rakke või rakke, mille modaalne kromosoomiarv on muutunud, ei kasutata. Rakuliinide ja primaarsete rakukultuuride puhul tuleb saavutada normaalne rakutsükliks kuluv aeg ja see peab vastama rakkude kohta avaldatud iseloomulikele näitajatele.

▼M7

Rakukultuuride ettevalmistamine

Rakuliinid: rakke kasvatatakse tüvikultuurist, külvates neid söötmesse sellise tihedusega, et rakud jätkaksid nii suspensioonis kui ka monokihina eksponentsiaalset kasvamist kuni nende kogumiseni (nt monokihina kasvavate rakkude puhul tuleb konfluentsust vältida).

Lümfotsüüdid: antikoagulandiga (nt hepariin) töödeldud täisverd või eraldatud lümfotsüüte kasvatatakse (nt 48 tundi inimese lümfotsüütide puhul) mitogeeni juuresolekul (nt fütohemaglutiniin (PHA) inimese lümfotsüütide puhul), et indutseerida raku jagunemine enne töötlemist uuritava kemikaali ja *cytoB*-ga.

Metaboolne aktivatsioon

Eksogeenseid metaboliseerivaid süsteeme tuleb kasutada juhul, kui kasutatavate rakkude endogeenne metaboliseerimisvõime on ebapiisav. Kui ei ole põhjendatud muu süsteemi kasutamist, soovitatakse vaikevalikuna kõige sagedamini kasutatavat süsteemi, milleks on näriliste (tavaliselt roti) maksast valmistatud postmitokondriline fraktsioon S9, millele on lisatud kofaktor ning mida on töödeldud ensüümide induktoritega, nagu Aroclor 1254 (56, 57) või fenobarbitaali ja b-naftoflavooni kombinatsiooniga (58–60). Viimane kombinatsioon ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (*Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants* (61)) ning on mitme funktsiooniga oksüdaaside induktorina osutunud sama tõhusaks kui Aroclor 1254 (58–60). S9-fraktsiooni kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonivahemikus 1–2 % (mahuprotsent), kuid kontsentratsiooni võib suurendada kuni 10 %-ni (mahuprotsent) katse lõplikus söötmes. Ühendeid, mis vähendavad mitoosiindeksit, eriti kaltsiumiga komplekse moodustavaid ühendeid (62), tuleb vältida töötlemise ajal. Uuritavate kemikaalide klass võib mõjutada kasutatava eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi või ensüümi induktori tüübi ja kontsentratsiooni valikut.

Uuritava kemikaali preparaatide valmistamine

Enne rakkude töötlemist tuleb tahke uuritav kemikaal lahustada sobivas lahustis ja vajaduse korral lahjendada. Vedelat uuritavat kemikaali võib lisada katsesüsteemile vahetult ja/või lahjendada seda enne katsesüsteemile lisamist. Gaasi või lenduva kemikaalide kasutamiseks katsetes tuleb katsemetoodikat asjakohaselt muuta, näiteks teha töötlusetapp suletud anumas (63–65). Uuritava kemikaali preparaadid tuleb valmistada vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui nende stabiilsuse andmetest nähtub, et neid võib säilitada.

Katsetingimused

Lahustid

Lahusti tuleb valida nii, et uuritava kemikaali lahustuvust saaks parandada, ilma et see moonutaks katse käiku (nt muudaks rakkude kasvukiirust, muudaks uuritavat kemikaali, reageeriks rakkude kasvunõuga, kahjustaks metaboolse aktivatsiooni süsteemi). Kui see on vähegi võimalik, on esimese võimalusena soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti (või söötme) kasutamist. Tavalised lahustid on näiteks vesi või dimetüülsulfoksiid (DMSO). Üldiselt ei tohiks orgaanilise lahusti sisaldus ületada 1 % (mahuprotsent). Kui *cytoB* lahustatakse DMSO-s, ei tohiks uuritava kemikaali ja *cytoB* puhul mõlema lahustamiseks kasutatud orgaanilise lahusti kogus kokku ületada 1 % (mahuprotsent); vastasel juhul tuleb teha lahusti kontrolli katsed ja näidata, et orgaanilise lahusti sisaldusel ei ole kahjulikku toimet. Üldjuhul ei tohiks töötlusetapis kasutatavas lõppsöötmes vesilahustuva

▼M7

lahusti (füsioloogiline lahus või vesi) sisaldus ületada 10 % (mahuprotsent). Kui kasutatakse muid kui tavaliselt kasutatavaid lahusteid (nt etanooli või atsetooni), tuleb nende kasutamiseks esitada andmed, millest nähtub nende kokkusobivus uuritava kemikaali ja katsesüsteemiga ning genotoksilise toime puudumine kasutatud kontsentratsioonil. Tugiandmete puudumisel on oluline lisada lahustiga töötlemata kontrollid (vt 1. liide) ja lahusti kontrollid, et tõendada valitud lahustil kahjuliku või kromosoome mõjutava (nt aneuploidse või klastogeense) toime puudumist.

CytoB kasutamine tsütokineesi blokaatorina

Üks olulisemaid probleeme mikrotuumade *in vitro* katse tegemisel on tagada, et hinnatavad rakud oleksid töötlemise ajal või töötlemisjärgses inkubeerimisperioodis (kui seda kasutatakse) lõpetanud mitoosi. Mikrotuumade hindamisel tuleb seega piirduda üksnes selliste rakkudega, mis on töötlemise ajal või pärast seda läbinud mitoosi. Tsütokineesi blokeerimiseks on enim kasutatud ühendit *cytoB*, sest see inhibeerib aktiini polümerisatsiooni ja takistab sellega tütarrakkude lahknemist pärast mitoosi, mistõttu tekivad kahetuumalised rakud (6, 66, 67). Uuritava kemikaali toimet raku paljunemise kineetikale võib mõõta samal ajal *cytoB* kasutamisega. Kui kasutatakse inimese lümfotsüüte, tuleb *cytoB*-ga tsütokinees blokeerida, sest rakutsükli kestus on doonoriti erinev ning kõik lümfotsüüdid ei reageeri stimulatsioonile fütohemaglutiniiniga. *CytoB* kasutamine teiste rakutüüpide puhul ei ole kohustuslik, kui tõendatakse, et need on jagunenud, nagu on kirjeldatud punktis 27. Peale selle ei kasutata *cytoB*-d üldiselt juhul, kui mikrotuumade esinemist proovides hinnatakse läbivoolutsütomeetria meetoditega.

Laboril tuleb iga rakutüübi puhul määrata asjakohane *cytoB* kontsentratsioon, millega saavutatakse optimaalne kahetuumaliste rakkude sagedus lahusti kontrolli kultuurides, ning tõendada, et see tagab hindamiseks vajaliku kahetuumaliste rakkude arvu. *CytoB* sobiv kontsentratsioon on tavaliselt vahemikus 3–6 µg/ml (19).

Rakkude paljunemise ja tsütotoksilisuse mõõtmine ning uuritava kemikaali kontsentratsioonide valimine

Uuritava kemikaali suurimat kontsentratsiooni määrates tuleb vältida kontsentratsioone, mis võivad põhjustada valepositiivseid tulemusi, nagu kontsentratsioonid, mis põhjustavad liiga suurt tsütotoksilisust (vt punkt 29), söötmes sadestumist (vt punkt 30) või olulisi pH või osmolaalsuse muutusi (vt punkt 9). Kui uuritav kemikaal muudab lisamise hetkel oluliselt söötme pH-d, võib pH reguleerimiseks töötlusetapis kasutatavasse lõppsöötmesse lisada puhvrit, et vältida valepositiivseid tulemusi ja säilitada asjakohased rakkude kasvutingimused.

Rakkude paljunemise mõõtmisega veendutakse, et piisav arv uuritava kemikaaliga töödeldud rakke on katse ajal läbinud mitoosi ja et töötlusi tehakse tsütotoksilisuse sobival tasemel (vt punkt 29). Tsütotoksilisus tuleb määrata põhikatses nii metaboolse aktivatsiooniga kui ka ilma selleta, kasutades asjakohaseid rakusurma ja rakupopulatsiooni kasvu näitajaid (vt punkte 26 ja 27). Kuigi tsütotoksilisuse hindamine esialgses eelkatses võib osutuda kasulikuks, et paremini määrata põhikatses kasutatavad kontsentratsioonid, ei ole eelkatse tegemine kohustuslik. Kui tsütotoksilisust hinnatakse eelkatses, ei asenda need tulemused tsütotoksilisuse mõõtmist põhikatses.

Rakukultuuride töötlemine *cytoB*-ga ning ühe-, kahe- ja mitmetuumaliste rakkude suhtelise esinemissageduse määramine kultuuris on täpne meetod, millega saab mõõta, kuidas töötlemine mõjutab rakkude paljunemist ning milline on töötlemise tsütotoksiline või tsütostaatiline toime (6); sellega tagatakse, et mikroskoopiliselt hinnatakse ainult töötlemise ajal või pärast seda jagunenud rakke. Rakukultuuri kohta soovitatakse kasutada vähemalt 500 rakku, et määrata proliferatsiooniindeks blokeeritud tsütokineesi korral (*cytokinesis-block proliferation index*, CBPI)

▼M7

(6, 27, 68) või replikatsiooniindeks (*replication index*, RI) (vt valemid, 2. liide) ning hinnata töötluse tsütotoksilist ja tsütostaatilist toimet, võrreldes nende väärtusi töödeldud ja kontrolli kultuurides. Muude tsütotoksilisuse näitajate kaudu (nt raku terviklikkus, apoptoos, nekroos, metafaasis rakkude arv, rakutsükkel) võib saada kasulikku teavet, kuid neid ei saa kasutada CBPI või RI asemel.

Uuringute puhul, milles *cytoB*-d ei kasutata, on vaja tõendada, et rakud on kultuuris jagunenud, nii et suurem osa hinnatud rakkudest on jagunenud kemikaaliga töötluse ajal või pärast seda, vastasel juhul võib saada valenegatiivseid tulemusi. Soovitatakse mõõta rakupopulatsiooni suhtelist kahekordistumist (*relative population doubling*, RPD) või rakkude arvu suhtelist suurenemist (*relative increase in cell count*, RICC), et hinnata töötluse tsütotoksilist ja tsütostaatilist toimet (17, 68–71) (vt valemid, 2. liide). Proovivõtule eelneva ajavahemiku pikendamise korral (nt kokkupuude kemikaaliga 1,5–2 normaalse rakutsükli kestuse jooksul, mille järel kogutakse rakud täiendava 1,5–2 normaalse rakutsükli möödumisel, millega proovid võetakse normaalse rakutsükli kestusest kokku 3–4 korda pikema aja möödumisel, nagu on kirjeldatud punktis 38 ja 39) võib RPD-ga tsütotoksilisust alahinnata (71). Neil tingimustel võib RICC olla parem mõõdetav näitaja või võib õigema hinnangu anda tsütotoksilisuse hindamine pärast 1,5–2 normaalse rakutsükli kestuse möödumist. Muude tsütotoksilisuse või tsütostaasi näitajate kaudu (nt raku terviklikkus, apoptoos, nekroos, metafaasis rakkude arv, proliferatsiooniindeks, rakutsükkel, nukleoplasmasillad või tuumasopised) võib saada kasulikku teavet, kuid neid ei saa kasutada RPD või RICC asemel.

Lahusti kontrolli ja positiivseid kontrolle kaasa arvamata tuleb hinnata vähemalt kolme katsekontsentratsiooni, mis vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele (asjakohane tsütotoksilisus, rakkude arv jne). Sõltumata rakutüübist (rakuliinid või lümfotsüütide primaarkultuur) võib iga kontsentratsiooniga töödelda kas paralleelselt mitut või ainult ühte rakukultuuri. Kuigi soovitatav on kasutada paralleelkultuure, võib ka üksikkultuuride kasutamist aktsepteerida eeldusel, et nii ühe kui ka paralleelkultuuride puhul hinnatakse kokku ühesugune arv rakke. Üksikkultuuride kasutamine on eriti asjakohane, kui hinnatakse rohkem kui kolme kontsentratsiooni (vt punktid 44–45). Konkreetse kontsentratsiooniga sõltumatutest paralleelkultuuridest saadud tulemusi võib andmeanalüüsiks kokku arvestada. Uuritavate kemikaalide puhul, mille tsütotoksilisus on väike või millel see puudub, on tavaliselt sobivad kahe- kuni kolmekordsed kontsentratsiooniintervallid. Tsütotoksilisuse avaldumise korral peavad katseks valitud kontsentratsioonid katma vahemiku alates kontsentratsioonist, millel avaldub tsütotoksilisus (nagu on kirjeldatud punktis 29), ja hõlmama kontsentratsioonid, millel esineb mõõdukas ja väike (või olematu) tsütotoksilisus. Paljudel uuritavatel kemikaalidel on kontsentratsiooni-toime sõltuvuse kõver järsu tõusuga ja selleks, et saada andmeid väikese või mõõduka tsütotoksilisuse kohta või et uurida annuse-toime seost üksikasjalikult, tuleb kasutada väiksema intervalliga kontsentratsioone ja/või enam kui kolme kontsentratsiooni (üks kultuur või mitu paralleelkultuuri), eriti olukorras, kui vajatakse korduskatset (vt punkt 60).

Kui maksimumkontsentratsioon põhineb tsütotoksilisusel, on suurima kontsentratsiooni puhul eesmärk saavutada 55 ± 5 % tsütotoksilisusest soovitatavate tsütotoksilisuse näitajate (st RICC ja RPD vähenemine rakuliinide puhul, kui *cytoB*-d ei kasutata, ning CBPI või RI vähenemine kuni 45 ± 5 %, kui *cytoB*-d kasutatakse, võrreldes samaaegse negatiivse kontrolliga) põhjal (72). Hoolikas tuleb olla positiivsete tulemuste tõlgendamisel, kui need esinevad vaid selle 55 ± 5 % tsütotoksilisuse vahemiku ülemises osas (71).

▼M7

Halvasti lahustuva uuritava kemikaali puhul, mis ei ole tsütotoksiline kontsentratsioonidel, mis on väiksemad kui kõige väiksem kontsentratsioon, millel kemikaal enam ei lahustu, peab suurim analüüsitav kontsentratsioon kemikaaliga töötluse lõpus alati tekitama hägususe või silma või invertmikroskoobiga nähtav sademe. Isegi kui tsütotoksilisus avaldub suuremal kontsentratsioonil kui vähim kontsentratsioon, millel kemikaal enam ei lahustu, on soovitatav teha katse ainult ühe sellise kontsentratsiooniga, millel tekib hägusus või nähtav sade, sest sade võib toimet moonutada. Sademe moodustumise kontsentratsioonil tuleb hoolikalt veenduda, et sade ei mõjuta katse tegemist (nt värvimist või hindamist). Kasulikuks võib osutuda kemikaali lahustuvuse määramine söötmes enne katsega alustamist.

Kui ei sadet ega piiravat tsütotoksilisust ei täheldata, peab suurim kontsentratsioon katses vastama vähimale kontsentratsioonile järgmistest: 10 mM, 2 mg/ml või 2 µl/ml (73–75). Kui uuritava kemikaali koostis ei ole määratav, nt on see tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogiline materjal (UVCB) (76), keskkonnast saadud ekstrakt jne, võib iga koostisosa kontsentratsiooni suurendamiseks olla vajalik kasutada suuremat maksimaalset kontsentratsiooni (nt 5 mg/ml), kui sellega ei kaasne olulist tsütotoksilisust. Tuleb siiski märkida, et inimravimite suhtes võivad need nõuded olla teistsugused (93).

Kontrollid

Iga kogumise kohta tuleb ette näha ka samaaegsed negatiivsed kontrollid (vt punkt 21), milles töötluseks kasutatavale söötmele lisatakse vaid lahusti ja mille rakke käideldakse muus osas samamoodi kui uuritava kemikaaliga töödeldud kultuure.

Samaaegseid positiivseid kontrolle on vaja, et tõendada labori pädevust kasutatud katsemetoodika tingimustel määrata klastogeene ja aneugeene ning (kui asjakohane) eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhusust. Positiivsete kontrollide näited on esitatud allpool tabelis 1. Kui see on põhjendatud, võib kasutada alternatiivseid positiivseid kontrollkemikaale.

Praegu ei teata ühtegi aneugeeni, mille genotoksilisuse avaldumiseks oleks vaja metaboolset aktivatsiooni (17). Kuna *in vitro* genotoksilisuse katsed imetajarakkudega on piisavalt standarditud lühiajaliste töötluste puhul, mis tehakse paralleelkatsetena metaboolse aktivatsiooniga või ilma selleta, kasutades sama kestusega töötlust, võib positiivse kontrolli osas piirduda metaboolset aktiveerimist vajava klastogeeniga. Sel juhul tõendab üksainus klastogeenne positiivse kontrolli reaktsioon nii metaboolse aktivatsiooni süsteemi aktiivsust kui ka selle toimivust katsesüsteemis. Pikaajalise töötluse puhul (ilma S9-fraktsioonita) peab siiski olema oma positiivne kontroll, sest töötluse kestus erineb sellest, mida kasutatakse metaboolse aktivatsiooniga katses. Kui klastogeen valitakse ainsaks positiivseks kontrolliks lühiajalise töötluse korral, mis tehakse nii metaboolse aktivatsiooniga kui ka ilma selleta, tuleb metaboolse aktivatsioonita pikaajalise töötluse puhul selleks valida aneugeen. Nii klastogeensuse kui ka aneugeensuse positiivseid kontrolle tuleks kasutada metaboolselt kompetentsetes rakkudes, mis ei vaja S9-fraktsiooni.

Iga positiivse kontrolli puhul kasutatakse üht või enamat kontsentratsiooni, mis eelduse kohaselt põhjustab fooniga võrreldes korratavaid ja määratavaid suurenemisi, et näidata katsesüsteemi tundlikkust (st toime on selge, kuid ei paljasta kodeeritud mikroskoobipreparaatide identsust hindajale kohe), ning reaktsiooni ei tohi moonutada tsütotoksilisus, mis ületab selles katsemeetodis ette nähtud piire.

▼M7

Tabel 1

Labori pädevuse hindamiseks ja positiivsete kontrollide valimiseks soovitatavad võrdluskemikaalid

Kategooria	Kemikaal	CASi nr
1. **Metaboolse aktivatsioonita toimivad klastogeenid**		
	Metüülmetaansulfonaat	66-27-3
	Mitomütsiin C	50-07-7
	4-nitrokinoliin-*N*-oksiid	56-57-5
	Tsütosiinarabinosiid	147-94-4
2. **Metaboolset aktivatsiooni vajavad klastogeenid**		
	Benso[a]püreen	50-32-8
	Tsüklofosfamiid	50-18-0
3. **Aneugeenid**		
	Kolhitsiin	64-86-8
	Vinblastiin	143-67-9

KATSE KÄIK

Töötlemisskeem

Konkreetsel rakutsükli etapil toimiva aneugeeni või klastogeeni kindlakstegemise tõenäosuse maksimeerimiseks on väga oluline, et rakutsükli igal etapil töödeldaks uuritava kemikaaliga piisav arv rakke. Kõik töötlused tuleb alustada ja lõpetada rakkude eksponentsiaalse kasvu faasis ja rakupopulatsioon peab jätkama kasvamist kuni proovivõtuni. Seepärast võib töötlemisskeem rakuliinide ja primaarsete rakukultuuride puhul mõnevõrra erineda sellest, mida kasutatakse mitogeenset stimulatsiooni vajavate lümfotsüütide puhul nende rakutsükli käivitamiseks (17). Lümfotsüütide puhul on kõige tõhusam lähenemisviis alustada töötlemist uuritava kemikaaliga 44–48 tundi pärast stimulatsiooni fütohemaglutiniiniga, kui rakud jagunevad asünkroonselt (6).

Avaldatud andmetest (19) nähtub, et enamik aneugeene ja klastogeene tuvastatakse pärast 3–6 tundi kestvat lühiajalist töötlust, kas S9-fraktsiooni juuresolekul või ilma selleta, misjärel uuritav kemikaal eemaldatakse ja proovid võetakse ajahetkel, kui töötluse algusest on möödunud ligikaudu 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestust (7).

Negatiivse tulemuse kohta järelduse tegemiseks võib vaja minna põhjalikku hindamist, milleks tuleb läbi viia katsed kõigis kolmes eri katsetingimustega olukorras: kasutades lühiajalist töötlust kemikaaliga metaboolse aktivatsiooniga ja ilma selleta ning pikaajalist töötlust kemikaaliga ilma metaboolse aktivatsioonita (vt punktid 56–58).

— Rakud tuleb 3–6 tunniks viia kokkupuutesse uuritava kemikaaliga ilma metaboolse aktivatsioonita ja koguda need prooviks ajapunktis, mis vastab umbes 1,5–2,0 normaalsele rakutsükli kestusele töötlemise algusest arvates (19).

— Rakud tuleb 3–6 tunniks viia kokkupuutesse uuritava kemikaaliga metaboolse aktivatsiooni tingimustes ja koguda need prooviks ajapunktis, mis vastab umbes 1,5–2,0 normaalsele rakutsükli kestusele töötlemise algusest arvates (19).

▼M7

— Rakud tuleb viia kemikaaliga pidevasse kokkupuutesse ilma metaboolse aktivatsioonita kuni proovi kogumise ajani, mis vastab umbes 1,5–2,0 normaalsele rakutsükli kestusele.

Juhul kui üks eespool esitatud katsetingimustest andis positiivse tulemuse, võib muude katsetingimuste kohaldamine osutuda ebavajalikuks.

Kui on teada või tekib kahtlus, et uuritav kemikaal mõjutab rakutsükli kestust (nt nukleosiidi analoogide puhul), eriti p53-kompetentsete rakkude puhul (35, 36, 77), võib proovivõtuaega nihutada või taastusaega pikendada täiendava 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse võrra (kokku 3,0–4,0 rakutsüklit pärast lühiajalise ja pikaajalise töötluse algust). Need valikud on ette nähtud olukordade jaoks, kui võib tekkida uuritava kemikaali ja *cytoB* interaktsiooni probleem. Kui kasutatakse proovi võtmist pikema aja järel (nt kokku 3,0–4,0 rakutsükli kestust kultiveerimiseks), tuleb tagada, et rakud ikka veel aktiivselt jaguneksid. Näiteks võib 96 tunni möödumisel stimulatsioonist lümfotsüütide eksponentsiaalne kasv väheneda ning monokihtrakukultuurid võivad saavutada konfluentsuse.

Võimalikud rakkude töötlemise skeemid on esitatud tabelis 2. Sõltuvalt uuritava kemikaali stabiilsusest või reaktsioonivõimest või kasutatavate rakkude konkreetsest kasvunäitajatest võib üldisi töötlemisskeeme muuta, kuid seda tuleb põhjendada.

Tabel 2

Rakkude töötlemise ja kogumise ajad mikrotuumade tekke *in vitro* katses

CytoB-ga töödeldavad lümfotsüüdid, primaarsed rakud ja rakuliinid	+ S9 Lühiajaline töötlus	Töödeldakse 3–6 tundi S9-fraktsiooni juuresolekul; eemaldatakse S9-fraktsioon ja töötlemiseks kasutatud sööde; lisatakse värske sööde ja *cytoB*; kogutakse 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse möödumisel töötluse algusest.
	– S9 Lühiajaline töötlus	Töödeldakse 3–6 tundi; eemaldatakse töötlemiseks kasutatud sööde; lisatakse värske sööde ja *cytoB*; kogutakse 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse möödumisel töötluse algusest.
	– S9 Pikaajaline töötlus	Töödeldakse *cytoB* juuresolekul 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse jooksul; rakud kogutakse töötlusaja lõpus.
Ilma *cytoB*-ta töödeldavad rakuliinid (Kõik toimub eespool esitatud skeemide kohaselt, ainult *cytoB*-d ei lisata.)		

Monokihtkultuurides võib 3–6 tundi kestnud töötlemise lõpus olla mitootilisi rakke (eristatavad selle järgi, et on ümmargused ja irduvad kasvunõu pinnalt). Kuna mitootilised rakud irduvad kergesti, võib neid uuritavat kemikaali sisaldava söötme eemaldamisel kaotsi minna. Kui on tõendeid, et mitootiliste rakkude arv on kontrolliga võrreldes oluliselt suurem, mis viitab rakutsükli tõenäolisele peatumisele mitoosifaasis, tuleb rakud koguda tsentrifuugimisega ja külvata tagasi rakukultuuri, et vältida kogumise ajal mikrotuumade/kromosoomaberratsiooni tekke riskiga mitoosis olevate rakkude kaotamist.

▼M7

Rakkude kogumine ja mikroskoobipreparaadi valmistamine

Iga rakukultuur tuleb koguda ja käidelda eraldi. Rakkude ettevalmistamine võib hõlmata hüpotoonilist töötlust, kuid see etapp ei ole vajalik, kui rakkude piisav laotumine preparaadis saadakse muul viisil. Mikroskoobipreparaadi valmistamiseks võib kasutada muid meetodeid tingimusel, et hindamiseks saadakse kvaliteetsed rakupreparaadid. Tervikliku rakumembraani ja tsütoplasmaga rakud tuleb säilitada mikrotuumade määramiseks ja tsütokineesi blokeerimisega meetodi puhul kahetuumaliste rakkude usaldusväärseks määramiseks.

Mikroskoobipreparaate võib värvida mitmesuguste meetoditega, nagu näiteks Giemsa meetodiga või kasutades DNA-spetsiifilisi fluorestsentsvärvaineid. Sobiva fluorestsentsvärvaine kasutamisega (nt akridiinoranž (78) või Hoechst 33258 koos püroniin-Y-ga (79)) võib välistada mõned väärtulemused, mis on seotud muude kui DNA-spetsiifiliste värvainete kasutamisega. Kinetohoorivastaseid antikehi, nii klastogeensete kui ka aneugeensete protsesside suhtes tundlike (pantsentromeersete) DNA-proovidega tehtud FISH-i või praimerite põhist *in situ* märgistamist pantsentromeersete praimeritega koos DNA asjakohase kontrastvärvimisega võib kasutada, et teha kindlaks mikrotuumade sisaldus (tervikkromosoomid värvuvad, samal ajal kui atsentrilised kromosoomifragmendid ei värvu), kui pakub huvi mehhanistlik teave nende tekke kohta (16, 17). Klastogeenide ja aneugeenide eristamiseks võib kasutada muid meetodeid, kui nende tõhusus on tõendatud ja kui nad on valideeritud. Näiteks teatavate rakuliinide puhul võib väiksema kui 2n-ploidsusega tuumade kui hüpodiploidsete juhtude mõõtmise kaudu selliste meetoditega, nagu pildianalüüs, laserskaneeriv või läbivoolutsütomeetria, saada kasulikku teavet (80–82). Tuumade morfoloogia vaatlusel võib samuti leida viiteid võimaliku aneuploidsuse kohta. Peale selle võib kasulikuks osutuda kromosoomaberratsioonide metafaasis määramise katse, soovitatavalt sama tüüpi rakkude ja katsemetoodika võrreldava tundlikkusega, et teha kindlaks, kas mikrotuumad on põhjustatud kromosoomimurdudest (arvestades, et kromosoomide kadu ei ole kromosoomaberratsioonkatsega määratav).

Analüüs

Kõik mikroskoobipreparaadid, sealhulgas lahustiga töödeldud või töötlemata rakkude omad (kui neid kasutati) ning positiivsed kontrollid, tuleb enne mikrotuumade esinemissageduse mikroskoopilist analüüsi sõltumatult kodeerida. Kui kasutatakse automatiseeritud hindamist, näiteks läbivoolutsütomeetriat, laserskaneerivat tsütomeetriat või pildianalüüsi, tuleb kasutada asjakohaseid meetodeid süstemaatilise hälbe või triivi ohjamiseks. Sõltumata sellest, kas mikrotuumade loendamiseks kasutatakse automaatsüsteemi, tuleb samaaegselt hinnata selliseid näitajaid nagu CBPI, RI, RPD või RICC.

CytoB-ga töödeldud kultuurides tuleb iga kontsentratsiooni või kontrolli kohta mikrotuumade esinemissageduse hindamiseks analüüsida vähemalt 2 000 kahetuumalist rakku (83), mis paralleelproovide kasutamise korral jagatakse nende vahel võrdselt. Juhul kui annuse kohta kasutatakse ühte kultuuri (vt punkt 28), tuleb kultuuri kohta hinnata 2 000 kahetuumalist rakku sellest ainsast kultuurist (83). Kui iga kontsentratsiooni kohta on hindamiseks olemas oluliselt vähem kui 1 000 kahetuumalist rakku kahe paralleelkultuuri puhul või üheainsa kultuuri kasutamise korral oluliselt vähem kui 2 000 rakku ja kui olulist mikrotuumade esinemissageduse suurenemist ei täheldata, tuleb katset korrata suurema rakkude arvuga või vähem tsütotoksiliste kontsentratsioonidega, sõltuvalt sellest, mis on asjakohasem. Tuleb hoolega jälgida, et ei hinnataks ebakorrapärase kujuga kahetuumalisi rakke või rakke, mille kaks tuuma on väga erineva suurusega. Peale

▼M7

selle ei tohi kahetuumalisi rakke segi ajada preparaadis halvasti laotunud paljutuumaliste rakkudega. Rakke, mis sisaldavad rohkem kui kahte põhituuma, ei saa mikrotuumade analüüsimisel arvesse võtta, sest neis rakkudes võib mikrotuumade esinemissageduse lähtetase olla kõrgem (84). Ühetuumaliste rakkude hindamine on aktsepteeritav, kui uuritav kemikaal tõendatult segab *cytoB* toimimist. Sellisel juhul võib kasulik olla korduskatse, milles *cytoB*-d ei kasutata. Kasulikku teavet võib saada, kui hinnata lisaks kahetuumalistele rakkudele ka ühetuumalisi rakke (85, 86), kuid see ei ole kohustuslik.

Katsetes, milles rakuliine ei töödelda *cytoB*-ga, tuleb iga katsekontsentratsiooni või kontrolli kohta mikrotuumade esinemissageduse hindamiseks analüüsida vähemalt 2 000 kahetuumalist rakku (83), mis paralleelproovide kasutamise korral jagatakse nende vahel võrdselt. Kui iga kontsentratsiooni kohta kasutatakse ühte rakukultuuri (vt punkt 28), tuleb sellest ühest kultuurist hinnata vähemalt 2 000 rakku. Kui iga kontsentratsiooni kohta on hindamiseks olemas oluliselt vähem kui 1 000 kahetuumalist rakku kahe paralleelkultuuri kasutamise korral või üheainsa kultuuri kasutamise korral oluliselt vähem kui 2 000 rakku ja kui olulist mikrotuumade esinemissageduse suurenemist ei täheldata, tuleb katset korrata suurema rakkude arvuga või vähem tsütotoksiliste kontsentratsioonidega, sõltuvalt sellest, mis on asjakohasem.

Kui *cytoB*-d kasutatakse, tuleb määrata CBPI või RI (vt 2. liide), kasutades vähemalt 500 rakku kultuuri kohta. Kui töötlemine toimub *cytoB* manuluseta, on oluline tõendada, et rakud on kultuuris jagunenud, nagu on kirjeldatud punktides 24–28.

Labori pädevus

Labor peab piisava kogemuse saamiseks enne katse rutiinset kasutamist olema teinud katsesarja positiivsete kemikaalidega, mis toimivad eri mehhanismide kaudu (vähemalt üks metaboolse aktivatsiooniga kemikaal ja üks ilma ning üks, mis toimib aneugeense mehhanismi kaudu, ja mis on valitud tabelis 1 loetletud kemikaalide seast), ning erinevate negatiivsete kontrollidega (sealhulgas töötlemata kultuurid ja eri lahustid/vehiikulid). Nende positiivsete ja negatiivsete kontrollidega saadud toimed peavad olema kooskõlas teaduskirjanduse andmetega. Seda nõuet ei kohaldata kogemusega laborite puhul, kui on olemas varasemate katsete põhine andmebaas, nagu on määratletud punktides 49–52.

Positiivseks kontrolliks valitud kemikaale (vt tabel 1) tuleb uurida lühi- ja pikaajalise töötlusega ilma metaboolse aktivatsioonita ning samuti lühiajalise töötlusega metaboolse aktivatsiooni juuresolekul, et tõendada klastogeensete ja aneugeensete kemikaalide tuvastamiseks ja metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhususe määramiseks vajalikku pädevust ja kasutatud hindamismeetodi (mikroskoopiline analüüs, läbivoolutsütomeetria, laserskaneeriv tsütomeetria või kujutise analüüs) asjakohasust. Välja valitud kemikaalide puhul tuleb katsesüsteemi tundlikkuse ja dünaamilise vahemiku tõendamiseks valida kontsentratsioonivahemikud nii, et oleks võimalik saada foonist suuremaid ning korratavaid ja kontsentratsioonist sõltuvaid väärtusi.

Varasemad kontrolli andmed

Labor peab määrama:

— varasemate katsete alusel positiivse kontrolli tulemuste vahemiku ja jaotuse,

— varasemate katsete alusel negatiivse kontrolli (töötlemata proov, lahusti) tulemuste vahemiku ja jaotuse.

Kui hangitakse algandmeid varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse määramiseks, peavad paralleelsed negatiivse kontrolli andmed olema kooskõlas kontrolli kohta avaldatud andmetega (kui olemas). Kui kontrolli väärtuste jaotusele lisatakse uusi katseandmeid, peaksid negatiivse kontrolli paralleelid ideaaljuhul olema selle jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 % (87, 88). Labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste andmebaasi koostamisel tuleb alguses kasutada vähemalt 10 katse andmeid, kuid eelistatavalt peaks andmebaas sisaldama vähemalt 20 võrreldavatel tingimustel tehtud katse andmeid. Laboritel tuleb kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, selliseid nagu kontrollkaardid (nt vastavuskontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (88)), et määrata, kui suures

▼M7

ulatuses positiivse ja negatiivse kontrolli andmed varieeruvad, ja tõendada, et metoodika on laboris „kontrolli all“ (83). Täiendavaid soovitusi selle kohta, kuidas koguda ja kasutada varasemate katsete andmeid (st tulemuste varasemate andmete andmebaasi võtmise või sellest väljajätmise kriteeriumid ja konkreetse katse nõuetekohasuse kriteeriumid), võib leida kirjandusest (87).

Katse-eeskirja muudatuste puhul tuleb arvestada, kas need mõjutavad andmete vastavust neile andmetele, mis on labori varem tehtud kontrollide andmebaasis olemas. Oluliste mittevastavuste korral tuleb koostada uus varasemate kontrolli andmete andmebaas.

Negatiivse kontrolli andmed peaksid hõlmama mikrotuumadega rakkude esinemust ühes rakukultuuris või nende summat paralleelkultuuridest, nagu on kirjeldatud punktis 28. Negatiivse kontrolli paralleelide tulemused peaksid ideaaljuhul olema labori varasemate kontrolli tulemuste jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 % (87, 88). Kui negatiivse kontrolli paralleelide tulemused jäävad väljapoole usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %, võivad need olla varasemate kontrolli andmete jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmusliku võõrväärtusega ning on tõendatud, et katsesüsteem on „kontrolli all“ (vt punkt 50), ja ei ole tõendeid, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksitusega.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste esitamine

Kui kasutatakse tsütokineesi blokeerimise meetodit, võetakse mikrotuumade teket indutseeriva toime hindamisel arvesse mikrotuumade esinemise sagedust ainult kahetuumalistes rakkudes (sõltumatult mikrotuumade arvust ühe raku kohta). Hindamisel tuvastatud ühe, kahe või enama mikrotuumaga rakkude arvud võib esitada eraldi ja sellest võib saada kasulikku teavet, kuid see ei ole kohustuslik.

Paralleelselt tuleb mõõta kõikides kemikaaliga töödeldud, samuti negatiivse ja positiivse kontrolli kultuurides avalduva tsütotoksilise ja/või tsütostaatilise toime näitajad (16). Kui kasutatakse tsütokineesi blokeerimise meetodit, tuleb kõikide töödeldud ja kontrolli kultuuride puhul rakutsükli hilinemist mõõtvate näitajatena arvutada CBPI ja RI. Ilma *cytoB* juuresolekuta katse puhul tuleb kasutada kas RPD-d või RICC-id (vt 2. liide).

Andmed tuleb esitada iga kultuuri kohta eraldi. Lisaks tuleb tabelina esitada kõikide andmete kokkuvõte.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Katse nõuetekohasus põhineb järgmistel kriteeriumidel:

— paralleelse negatiivse kontrolli tulemused on vastuvõetavad, et lisada need labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste andmebaasi, nagu on kirjeldatud punktis 50;

— paralleelsed positiivsed kontrollid (vt punkt 50) peavad tekitama reaktsioone, mis on võrreldavad labori varasemate positiivse kontrolli tulemuste andmebaasi andmetega ning põhjustama statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga;

— lahustiga kontrollis peab olema täidetud rakkude paljunemise kriteerium (punktid 25–27);

— katsed on tehtud kõigi katsetingimustega, välja arvatud juhul, kui ühes neist on saadud positiivseid tulemusi (punktid 36–40);

— rakkude arv on piisav ja kontsentratsioonid on analüüsitavad (punktid 28 ja 44–46);

▼M7

— suurima annuse valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mis on kirjeldatud punktides 24–31.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt positiivsena, kui uuritud katsetingimustes (vt punktid 36-39):

— vähemalt ühel katsekontsentratsioonil esineb statistiliselt oluline suurenemine paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes (89);

— vähemalt ühe katse tingimustes on see suurenemine asjakohase trenditesti meetodiga hinnatuna annusest sõltuv (vt punkt 28);

— ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %; vt punkt 52).

Kui kõik need kriteeriumid on täidetud, järeldatakse, et kemikaal põhjustab sellel katsemeetodil kromosoomimurde ja/või kromosoomide lisandumist või kadu. Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta leiab ka kirjandusest (90–92).

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt negatiivsena, kui kõikides uuritud katsetingimustes (vt punktid 36–39):

— mitte ühelgi katsekontsentratsioonil ei esine statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;

— asjakohase trenditestiga hinnates ei esine annusest sõltuvat suurenemist;

— kõik need tulemused on labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %; vt punkt 52).

Sel juhul järeldatakse, et kemikaal ei saa sellel katsemeetodil põhjustada kromosoomimurde ja/või kromosoomide lisandumist või kadu. Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta leiab ka kirjandusest (90–92).

Selget positiivset või selget negatiivset toimet ei ole vaja kinnitada.

Juhul, kui kemikaali toime ei ole selgelt negatiivne ega selgelt positiivne, nagu eespool kirjeldatud, või selleks, et teha kindlaks tulemuse bioloogiline olulisus, hinnatakse andmeid eksperdihinnangu ja/või täiendavate uuringute abil. Kasulikuks võib osutuda lisarakkude hindamine (kui see on asjakohane) või korduskatse tegemine võimaluse korral muudetud tingimustel (nt kontsentratsioonivahemik, teistsugused metaboolse aktivatsiooni tingimused (nt S9-fraktsiooni kontsentratsioon või päritolu)).

Harvadel juhtudel ei võimalda andmestik isegi pärast täiendavaid uuringuid positiivsuse või negatiivsuse üle otsustamist ning seetõttu järeldatakse, et tulemus on ebaselge.

Mikrotuumade tekke *in vitro* katses põhjustavad kemikaalid mikrotuumade teket kromosoomide katkemise, kao või nende mõlema kaudu. Täiendavaks analüüsiks võib kasutada kinetohoorivastaseid antikehi, tsentromeerispetsiifilisi *in situ* proove või muid meetodeid, et teha kindlaks, kas mikrotuumade tekkemehhanism on seotud klastogeense ja/või aneugeense toimega.

▼M7

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumise kuupäev, kui olemas;

— uuritava kemikaali stabiilsus, kui teada.

— uuritava aine võime reageerida lahusti/vehiikuliga või rakukultuuri söötmega.

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui teada;

— pH, söötme osmolaalsuse ja sademe tekke mõõtmine rakusöötmes, millesse uuritavat kemikaali lisati.

Ühe koostisosaga aine:

— välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite keemilised nimetused vastavalt vajadusele ja praktilise teostatavusele jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:

— iseloomustatakse nii palju kui võimalik, lähtudes keemilistest identifitseerimisandmetest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Lahusti:

— lahusti valiku põhjendus;

— lahusti protsendiline sisaldus rakukultuuri lõplikus söötmes.

Rakud:

— kasutatud rakkude tüüp ja päritolu;

— kasutatud rakutüübi sobivus;

— rakuliinide puhul: mükoplasma puudumine;

— rakuliinide puhul: teave rakutsükli kestuse või proliferatsiooniindeksi kohta;

— kui kasutatakse lümfotsüüte, siis veredoonorite sugu, vanus ja muu asjakohane teave doonori, täisvere või eraldatud lümfotsüütide kohta, kasutatud mitogeen;

— normaalse (negatiivse kontrolli) rakutsükli kestus;

— rakuliinide puhul: passaažide arv, kui olemas;

— rakuliinide puhul: rakukultuuride säilitamise meetodid;

— rakuliinide puhul: modaalne kromosoomiarv.

▼M7

Katsetingimused:

— kui kasutatakse, siis tsütokineesi blokeeriva aine (nt *cytoB*) identifitseerimisandmed, selle kontsentratsioon ja rakkude kokkupuute kestus sellega;

— uuritava kemikaali kontsentratsioon, väljendatuna lõppkontsentratsioonina söötmes (nt µg või mg/ml või mM söötmes);

— kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhimõtted, sealhulgas tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud;

— söötme koostis, CO_2 kontsentratsioon, kui asjakohane, niiskusesisaldus;

— söötmele lisatud lahusti ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (ja/või ruumala);

— inkubeerimise temperatuur ja kestus;

— töötluse kestus;

— pärast töötlemist rakkude kogumise aeg;

— rakkude tihedus külvamisel, kui asjakohane;

— metaboolse aktivatsiooni süsteemi tüüp ja koostis (S9-fraktsiooni allikas, S9-fraktsiooni segu valmistamise meetod, S9-fraktsiooni segu ja S9-fraktsiooni kontsentratsioon või ruumala lõppsöötmes, S9-fraktsiooni kvaliteedikontrollid (nt ensümaatiline aktiivsus, steriilsus, metaboliseerimisvõime);

— positiivse ja negatiivse kontrolli kemikaalid, lõppkontsentratsioonid, töötlus- ja taastusaja tingimused ja kestus;

— mikroskoobipreparaatide valmistamise meetodid ja kasutatud värvimismeetodid;

— mikrotuumadega rakkude hindamise kriteeriumid (analüüsitavate rakkude valimine ja mikrotuumade tuvastamine);

— analüüsitud rakkude arv;

— tsütotoksilisuse mõõtmise meetodid;

— muu täiendav asjakohane teave tsütotoksilisuse ja kasutatud meetodi kohta;

— kriteeriumid, mille alusel uuringutulemus klassifitseeritakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks;

— kasutatud statistilise analüüsi meetod(id);

— vajaduse korral meetodid, millega uuriti, kas mikrotuum sisaldab terveid kromosoome või nende fragmente, näiteks kinetohoorivastaste antikehade või pantsentromeersete DNA-proovide kasutamine.

— pH, osmolaalsuse ja sademe määramiseks kasutatud meetodid.

Tulemused:

— analüüsi jaoks sobivate rakkude määratlus;

— *cytoB* juuresolekuta katse puhul töödeldud rakkude arv ja kogutud rakkude arv iga rakukultuuri kohta, kui kasutatakse rakuliine;

▼M7

— tsütokineesi blokeerimise meetodi kasutamise korral määratud tsütotoksilisuse näitaja, näiteks CBPI või RI; kui tsütokineesi blokeerimise meetodeid ei kasutatud, siis RICC või RPD; muud vaatlustulemused (näiteks rakkude konfluentsus, apoptoos, nekroos, metafaaside arv, kahetuumaliste rakkude esinemissagedus);

— sademe tekke tunnused ja määramise aeg;

— andmed söötme pH ja osmolaalsuse kohta, kui need on määratud;

— ühe-, kahe- ja paljutuumaliste rakkude jaotus, kui kasutatakse tsütokineesi blokeerimise meetodit;

— mikrotuumadega rakkude arv iga töödeldud ja kontrollkultuuri kohta eraldi; vajaduse korral tuleb määratleda, kas see on määratud kahe- või ühetuumalistest rakkudest;

— kontsentratsiooni-toime vaheline seos, kui võimalik;

— paralleelse negatiivse (lahusti) ja positiivse kontrolli andmed (kontsentratsioonid ja lahustid);

— varasemate negatiivse ja positiivse kontrolli katsete andmed, sh vahemik, keskväärtused, standardhälbed ja jaotuse usaldusvahemik usaldatavustasemel 95 %, samuti mõõtepunktide arv;

— statistiline analüüs; p-väärtused, kui need on asjakohased.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

KIRJANDUS

(1) OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997), „Towards a validation of the micronucleus test“, *Mutation Research,* Vol. 392/1–2, pp. 1–4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993), „The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project“, *Mutation Research,* Vol. 287/1, pp. 3–15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985), „Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay“, *Cytobios,* Vol. 43/172–173, pp. 233–246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000), „Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35/3, pp. 167–172.

(6) Fenech, M. (2007), „Cytokinesis-block micronucleus cytome assay“, *Nature Protocols,* Vol. 2/5, pp. 1084–1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986), „Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation“, *Mutation Research,* Vol. 161/2, pp. 193–198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989), „Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody“, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, pp. 34–43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990), „Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe“, *Mutation Research,* Vol. 234/5, pp. 9–20.

(10) Miller, B.M. *et al*. (1991), „Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA“, *Mutagenesis,* Vol. 6/4, pp. 297–302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993), „The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes“, *Mutagenesis,* Vol. 8/4, pp. 329–334.

(12) Migliore, L. *et al*. (1993), „Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe“, *Mutation Research,* Vol. 319/3, pp. 205–213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993), „Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization“, *Mutagenesis,* Vol. 8/6, pp. 519–525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994), „Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes“, *Mutation Research,* Vol. 322/1, pp. 9–20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996), „Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy“, *Mutation Research,* Vol. 372/2, pp. 233–245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996), „Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes“, *Mutation Research,* Vol. 372/2, pp. 211–219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003), „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“, *Mutation Research,* Vol. 540/2, pp. 153–163.

(18) Käesoleva lisa peatükk B.10, „*In vitro* kromosoomaberratsioonkatse imetajarakkudega“.

(19) Lorge, E. *et al*. (2006), „SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study“, *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 13–36.

(20) Clare, G. *et al*. (2006), „SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes“, *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006), „SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells“, *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 61–87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006), „SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells“, *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 88–124.

(23) Oliver, J. *et al*. (2006), „SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells“, *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 125–152.

(24) Albertini, S. *et al*. (1997), „Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience“, *Mutation Research,* Vol. 392/1–2, pp. 187–208.

(25) Miller, B. *et al*. (1997), „Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience“, *Mutation Research,* Vol. 392/1–2, pp. 45–59.

▼**M7**

(26) Miller, B. *et al*. (1998), „Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test“, Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, pp. 81–116.

(27) Kalweit, S.*et al*. (1999), „Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches“, *Mutation Research,* Vol. 439/2, pp. 183–190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999), „The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity“, *Mutation Research,* Vol. 445/1, pp. 55–71.

(29) von der Hude, W. *et al*. (2000), „*In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances“, *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137–163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002), „A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity“, *Mutation Research,* Vol. 517/1–2, pp. 123–134.

(31) Matsushima, T. *et al*. (1999), „Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU)“, *Mutagenesis,* Vol. 14/6, pp. 569–580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006), „Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test“, *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 1–152.

(33) Kirkland, D. (2010), „Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial“, *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139–147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011), „Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells“, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28–36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011), „Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52/5, pp. 373–384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995), „A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test“, *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3–4, pp. 105–115.

(37) ECVAM (2006), „Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing“, ESAC 25th meeting, 16.–17. november 2006. Kättesaadav aadressil: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, „Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel“. Kättesaadav aadressil: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. jt (2008), „ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT)“, *Mutagenesis,* Vol 23/4, lk 271–283.

(40) ILSI paper (käsikiri), Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. „Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing“, *Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. *et al*. (1991), „International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9“, *Mutation Research,* Vol. 257/2, pp. 147–205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992), „Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells“, *Mutation Research,* Vol. 268/2, pp. 297–305.

(43) Brusick, D. (1986), „Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations“, *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789–886.

(44) Long, L.H. *et al*. (2007), „Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium“, *Mutation Research,* Vol. 634/1–2, pp. 177–183.

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008), „Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid“, *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439–452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985), „Measurement of micronuclei in lymphocytes“, *Mutation Research,* Vol. 147/1–2, pp. 29–36.

(47) Fenech, M. (1997), „The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method“, *Mutation Research,* Vol. 392, pp. 11–18.

(48) Payne, C.M. *et al*. (2010), „Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis“, *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825–840.

(49) Bazin, E. *et al*. (2010), „Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG“. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51/3, pp. 251–259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010), „Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays“, *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555–560.

(51) Josse, R. *et al*. (2012), „An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay“, *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295–304.

(52) Ehrlich, V. *et al*. (2002), „Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells“, *Mutagenesis,* Vol. 17/3, pp. 257–260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004), „Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge“, *Toxicology,* Vol. 198/1–3, pp. 315–328.

(54) Gibson, D.P. *et al*. (1997), „Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals“, *Mutation Research,* Vol. 392/1–2, pp. 61–70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001), „HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei“, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 37/1, pp. 31–45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), „Revised methods for the Salmonella mutagenicity test“, *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, pp. 173–215.

(57) Ong, T.-M. *et al*. (1980), „Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver“, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55–65.

▼**M7**

(58) Elliot, B.M. *et al*. (1992), „Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays“, *Mutagenesis,* Vol. 7, pp. 175–177.

(59) Matsushima, T. jt (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, väljaandes *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), „Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9“, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, pp. 51–59.

(61) UNEP (2001), „Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP)“ (Püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon, ÜRO keskkonnaprogramm (UNEP)). Kättesaadav aadressil: http://www.pops.int/

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), „Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes“, *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225–8.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91–103.

(64) Zamora, P.O. jt (1983), „Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay“, *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795–801.

(65) Asakura, M. *et al*. (2008), „An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay“, *Mutation Research,* Vol. 652/2, pp. 122–130.

(66) Fenech, M. (1993), „The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations“, *Mutation Research,* Vol. 285/1, pp. 35–44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002), „A protocol for the *in vitro* micronucleus test. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity“, *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, pp. 103–112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004), „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“. *Mutation Research,* Vol. 564, pp. 97–100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008), „Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects“, *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, pp. 1–3.

(70) Surralles, J. *et al*. (1995), „Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures“, *Mutation Research,* Vol. 341/3, pp. 169–184.

(71) Honma, M. (2011), „Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86–87.

(72) Pfuhler, S. *et al*. (2011), „*In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop“, *Mutation Research,* Vol. 723/2, pp. 101–107.

(73) OECD (2014), „Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487)“, ENV/JM/TG(2014)17. Nõude esitamisel kättesaadav.

▼M7

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012), „Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity“, *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32–56.

(75) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013)., „Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54/1, pp. 36–43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), „Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances“, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. *et al*. (2012), „Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells“, *Mutation Research,* Vol. 746/1, pp. 29–34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), „An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test“, *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 241–247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), „A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y“, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269–275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011), „Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52/4, pp. 280–286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011), „*In vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52/5, pp. 355–362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010), „Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies“, *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33–40.

(83) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS),Series on testing and assessment*, nr 198, OECD Publishing, Pariis.

(84) Fenech, M. *et al*. (2003), „HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures“, *Mutation Research,* Vol. 534/1–2, pp. 65–75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998), „Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay“, *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193–8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011), „The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance“, *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, pp. 873–99.

(87) Hayashi, M. jt (2010), „Compilation and use of genetic toxicity historical control Data“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87–90.

(88) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003), „*In vitro* micronucleus test“, väljaandes *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463–467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. *et al*. (1987), „Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1–175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al*. (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays“, väljaandes *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–154.

(93) USFDA, „International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use“.

▼M7

1. liide

MÕISTED

Aneugeen – iga kemikaal või protsess, mis põhjustab interaktsiooni kaudu mitootilise või meiootilise rakujagunemise tsükli komponentidega rakkude või organismide aneuploidsust.

Aneuploidsus – iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidsus).

Apoptoos – programmeeritud rakusurm, mida iseloomustab rida etappe, mis viivad raku lagunemiseni membraaniga seotud osakesteks, mis kõrvaldatakse fagotsütoosiga või osakeste raku membraanilt koorumise teel (*shedding*).

Genotoksiline – üldtermin, mis hõlmab kõiki DNA- või kromosoomikahjustuse tüüpe, sealhulgas murde, deletsioone, adukte, nukleotiidide modifikatsioone ja sidemete teket, ümberpaigutusi, geenimutatsioone, kromosoomaberratsioone ja aneuploidsust. Kõik genotoksiliste toimete tüübid ei põhjusta mutatsioone või püsivat kromosoomikahjustust.

Interfaasirakud – rakud, mis ei ole mitoosifaasis.

Kemikaal – aine või segu.

Kinetohoor – valguline struktuur, mis moodustub kromosoomi tsentromeersel piirkonnal ja millele kinnituvad raku jagunemise ajal kääviniidid, võimaldades tütarkromosoomide korrastatud liikumist tütarrakkude poolustele.

Klastogeen – iga aine või protsess, mis tekitab rakkude või eukarüootsete organismide populatsioonides struktuurseid kromosoomaberratsioone.

Kontsentratsioonid – tähendavad uuritava kemikaali lõppkontsentratsioone söötmes.

Kromatiidide lahknematus – paardunud kromatiidid ei eraldu teineteisest ega jaotu normaalselt tekkivate tütarrakkude vahel, mille tulemusena on tütarrakkude kromosoomiarvud ebanormaalsed.

Käesoleva katsemeetodiga ilma *cytoB* juuresolekuta tehtud katsetes määratletakse tsütotoksilisus töödeldud rakkude RPD (rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine) või RICC (rakkude arvu suhteline suurenemine) vähenemisena negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punkt 27 ja 2. liide).

Lahusti kontroll – üldtermin, millega tähistatakse kontrollikultuure, kuhu lisatakse ainult uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahusti.

Maksa S9-fraktsioon – maksa homogenaadi supernatant, mis on eraldatud pärast tsentrifuugimist 9 000 g juures, st maksa toorekstrakt.

Mikrotuumad – rakus põhituumast eraldi ja lisaks sellele esinevad väikesed tuumad, mis on tekkinud mitoosi või meioosi telofaasi ajal mahajäänud kromosoomifragmentidest või tervetest kromosoomidest.

Mitoos – rakutuuma jagunemine, mis tavaliselt jagatakse profaasiks, prometafaasiks, metafaasiks, anafaasiks ja telofaasiks.

Mitoosiindeks – suhtarv, mis saadakse, kui vaatlusaluse rakupopulatsiooni metafaasis olevate rakkude arv jagatakse rakkude koguarvuga; näitab rakkude proliferatsioonitaset kõnealuses populatsioonis.

▼M7

Mutageenne – tekitab päriliku muutuse geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomaberratsioonid).

p53 staatus – p53 on valk, mis on seotud rakutsükli, apoptoosi ja DNA reparatsiooni reguleerimisega. Teoreetiliselt peaksid geenimutatsioonid või kromosoomaberratsioonid kergemini tekkima rakkudes, milles puudub funktsionaalne p53 valk ja mis seetõttu ei ole võimelised rakutsüklit peatama või kõrvaldama kahjustunud rakke apoptoosi või teiste DNA kahjustuse vallandatud ja p53 funktsioonidega seotud mehhanismide kaudu (nt DNA reparatsiooni indutseerimine).

Polüploidsus – rakkude või organismi genoommutatsioon, mis hõlmab terveid kromosoomistikke, erinevalt sellisest genoommutatsioonist, mis hõlmab üksikute kromosoomide arvu muutust (aneuploidsus).

Proliferatsiooniindeks (*Proliferation Index*, PI) – tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui *cytoB*-d ei kasutata (vt valem, 2. liide).

Proliferatsiooniindeks blokeeritud tsütokineesi korral (*cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) – teise rakujagunemise rakkude osakaal töödeldud rakupopulatsioonis, võrreldes töötlemata kontrolliga (vt valem, 2. liide).

Rakkude arvu suhteline suurenemine (*Relative Increase in Cell Count*, RICC) – tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui *cytoB*-d ei kasutata (vt valem, 2. liide).

Rakkude paljunemine – rakkude arvu suurenemine mitootilise rakujagunemise tagajärjel.

Rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine (*Relative Population Doubling*, RPD) – tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui *cytoB*-d ei kasutata (vt valem, 2. liide).

Replikatsiooniindeks (*Replication Index*, RI) – täielikult läbitud rakujagunemistsüklite osakaal töödeldud rakukultuuris kemikaaliga kokkupuute ja taastumise ajal, võrreldes töötlemata kontrolliga (vt valem, 2. liide).

S9-fraktsiooni segu – S9-fraktsiooni ja metaboolsete ensüümide aktiivsuse jaoks vajalike kofaktorite segu.

Tsentromeer – kromosoomi DNA-piirkond, kus mõlemad kromatiidid on teineteisega seotud ja mille külge kinnituvad kõrvuti mõlemad kinetohoorid.

Tsütokinees – mitoosile vahetult järgnev rakujagunemise protsess, mille tulemusel tekivad kaks tütarrakku, milles mõlemas on üksainus tuum.

Tsütostaas – rakkude kasvu inhibeerumine (vt valem, 2. liide).

Tsütotoksilisus – käesoleva katsemeetodiga *cytoB* juuresolekul tehtud katsetes määratletakse tsütotoksilisus kui töödeldud rakkude CBPI (proliferatsiooniindeks blokeeritud tsütokineesi korral) või RI (replikatsiooniindeks) vähenemine negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punkt 26 ja 2. liide).

Töötlemata kontroll – paralleelsed rakukultuurid, mida ei ole töödeldud (st ei uuritava kemikaali ega lahustiga), kuid mida on käideldud samaaegselt samal viisil kui uuritava kemikaaliga töödeldud rakukultuure.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M7

2. liide

TSÜTOTOKSILISUSE HINDAMISE VALEMID

Kui kasutatakse cytoB-d, tuleb tsütotoksilisust hinnata **CBPI (proliferatsiooniindeks blokeeritud tsütokineesi korral)** või **RI (replikatsiooniindeks) alusel** (17, 69). CBPI näitab tuumade keskmist arvu raku kohta ja seda võib kasutada rakkude paljunemise arvutamiseks. RI näitab rakutsüklite keskmist arvu raku kohta *cytoB*-ga kokkupuute ajavahemiku jooksul töödeldud kultuurides kontrollkultuuridega võrreldes ning seda saab kasutada tsütostaasi osakaalu (%) arvutamiseks.

$$\text{tsütostaasi \%} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

ning:

T = uuritava kemikaaliga töödeldud kultuur

C = kontrollkultuur

kus:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{1tuumaliste rakkude arv}) + (2 \times \text{2tuumaliste rakkude arv}) + (3 \times \text{paljutuumaliste rakkude arv}))}{(\text{Rakkude üldarv})}$$

Seega vastab CBPI väärtus 1 (kõik rakud on ühetuumalised) 100 % tsütostaasile.

Tsütostaas = 100 – RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{2tuumaliste rakkude arv}) + (2 \times \text{paljutuumaliste rakkude arv}))/(\text{Rakkude üldarv})_T}{((\text{2tuumaliste rakkude arv}) + (2 \times \text{paljutuumaliste rakkude arv}))/(\text{Rakkude üldarv})_C} \times 100$$

T = töödeldud kultuurid

C = kontrollkultuurid

RI = 53 % tähendab seega, et võrreldes kontrollkultuuris jagunenud rakkude arvuga, mille puhul moodustusid kahe- ja enamatuumalised rakud, on töödeldud kultuuris jagunenud kõigest 53 % sellest arvust, see tähendab 47 % rakke on tsütostaasis.

Kui cytoB-d ei kasutata, soovitatakse (69) tsütotoksilisust hinnata **RICC (rakkude arvu suhteline suurenemine)** või **RPD (rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine)** alusel, sest mõlema näitaja puhul võetakse arvesse jagunenud rakkude osakaalu rakupopulatsioonis.

$$\textbf{RICC}(\textbf{\%}) = \frac{(\text{rakkude arvu suurenemine töödeldud kultuurides(lõplik} - \text{alguses}))}{(\text{rakkude arvu suurenemine kontrolli kultuurides(lõplik} - \text{alguses}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\textbf{\%}) = \frac{(\text{populatsiooni kahekordistumiste arv töödeldud kultuurides})}{(\text{populatsiooni kahekordistumiste arv kontrolli kultuurides})} \times 100$$

kus:

populatsiooni kahekordistumine = [log (rakkude arv pärast töötlust ÷ rakkude algarv)] ÷ log 2

Seega tähendab 53 % RICC või RPD, et 47 % esines tsütotoksilisust/tsütostaasi.

▼**M7**

Kasutades **proliferatsiooniindeksit (PI)**, võib tsütotoksilisust hinnata ühest rakust koosnevate kloonide (cl1), kahest rakust koosnevate kloonide (cl2), 3–4 rakust koosnevate kloonide (cl4) ja 5–8 rakust koosnevate kloonide (cl8) arvu loendamise abil.

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

Proliferatsiooniindeksit (PI) on kasutatud tsütotoksilisuse väärtusliku ja usaldusväärse näitajana *in vitro cytoB* juuresolekuta kultiveeritud rakuliinides (35–38) ja seda võib käsitada kasuliku lisaparameetrina.

Igal juhul peab rakkude arv enne töötlust olema töödeldud kultuurides ja negatiivse kontrolli kultuurides ühesugune.

Kuigi varem on tsütotoksilisuse näitajana kasutatud RCC-d (st rakkude arv töödeldud kultuuris / rakkude arv kontrollikultuuris), ei ole see enam soovitatav, sest sellega võib tsütotoksilisust alahinnata.

Kui kasutatakse automatiseeritud hindamissüsteemi, näiteks läbivoolutsütomeetriat, laserskaneerivat tsütomeetriat või pildianalüüsi, võib valemis rakkude arvu asendada tuumade arvuga.

Negatiivse kontrolli kultuurides peab rakupopulatsiooni kahekordistumine või replikatsiooniindeks olema kooskõlas nõudega võtta rakukultuurist proov ajahetkel, mis vastab ligikaudu 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse möödumisele.

▼M3

B.50. **NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÕLMEDE KATSE: DA**

SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Esialgne katsemeetod (B.42) naha sensibiliseerimise määramiseks hiirtel lokaalsete lümfisõlmede katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429) on läbi vaadatud (1). Kirjanduses on avaldatud LLNA valideerimise üksikasjad ja ülevaade sellega seotud töödest (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). LLNA-meetodi järgi kasutatakse lümfotsüütide paljunemise määramiseks radioaktiivse isotoobiga märgistatud tümidiini või joodi ja seepärast ei saa katset kasutada, kui radioaktiivsete ühendite hankimine, kasutamine või kõrvaldamine tekitab probleeme. LLNA: DA (mille töötas välja Daicel Chemical Industries, Ltd.) on LLNA variant, mis on vaba radioaktiivsusest ja milles lümfotsüütide paljunemise näitajana kasutatav adenosiintrifosfaadi (ATP) sisaldus määratakse bioluminestsentsi abil. Katsemeetod LLNA: DA on valideeritud ja läbi vaadatud ning rahvusvaheline eksperdihinnangu komisjon soovitab seda, kuna leiab, et see sobib naha sensibiliseerumist põhjustavate ja mittepõhjustavate kemikaalide kindlakstegemiseks, arvestades teatavaid piiranguid (10, 11, 12, 13). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Käesoleva lisa peatükis B.6 ja OECD katsejuhendis 406 kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (14). LLNAd (käesoleva lisa peatükk B.42, OECD katsejuhis 429) ja selle kahte radioaktiivsuse kasutamiseta versiooni, need on LLNA: DA (käesoleva lisa peatükk B.50, OECD katsejuhis 442 A) ja LLNA: BrdU-ELISA (käesoleva lisa peatükk B.51, OECD katsejuhis 442 B), tuleb eelistada meriseakatsetele peatükis B.6, OECD katsejuhis 406 (14), kuna nendega vähendatakse ja täiustatakse katseloomade kasutamist.

2. Nii nagu LLNA puhul, uuritakse LLNA: DA katsetes naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Lisaks kõrvaldab võimalus määrata naha sensibiliseerijaid ilma DNA radioaktiivset märgist kasutamata tööalase kokkupuute radioaktiivsusega ja radioaktiivsete jäätmete probleemi. See omakorda võimaldab naha sensibiliseerijate määramiseks kasutada rohkem hiiri, millega võiks veelgi väheneda merisigade kasutamine (s.o peatükk B.6, OECD katsejuhis 406) (14) selleks otstarbeks.

MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA: DA on muudetud LLNA-meetod võimalike nahka sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks, millel on aga teatavad piirangud. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada LLNA või merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (14) asemel LLNA: DAd, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist (10, 11). Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine

▼M3

kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave hõlmab aine nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi ja struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA: DA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA: DA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

5. LLNA: DA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Sellega on siiski võimalik vähendada katseloomade kasutamist selleks otstarbeks, võrreldes merisigadega tehtavate katsetega (B.6, OECD katsejuhis 406) (14). Lisaks võimaldab LLNA: DA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks (vähem tekitatakse valu ja kannatusi), kuna erinevalt B.6st ja OECD katsejuhendist 406 ei eelda LLNA: DA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioone. Hoolimata LLNA: DA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 (14) kohaste katsetega võrreldes on teatud piirangud, mis võivad tingida B.6 või OECD katsejuhendi kohaste katsete 406 kasutamist (nt teatavate metallide katsetamine, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teatavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (6) (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42), uuritavate ainete lahustuvus). Lisaks võib teatavate kemikaaliklasside või ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivaid funktsionaalseid rühmi (16), olla vaja kasutada meriseakatseid (st B.6 või OECD katsejuhendit 406 (14)). LLNA puhul kindlaks tehtud piiranguid (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42) on peetud kehtivateks ka LLNA: DA puhul (10). Lisaks ei tarvitse LLNA: DA kasutamine olla sobiv selliste ainete uurimiseks, mis mõjutavad ATP taset (näiteks ATP inhibiitorina toimivad ained) või segavad rakusisese ATP täpset määramist (nt ATPd lagundavate ensüümide juuresolek, rakuvälise ATP olemasolu lümfisõlmes). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA: DA olema kohaldatav igasuguste ainete uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNA: DAga saadavate tulemuste õigsust. Lisaks sellele tuleks kaaluda piiripealse positiivse tulemuse võimalust, kui stimulatsiooniindeksi (SI) väärtus tuleb vahemikku 1,8–2,5 (vt punktid 31–32). See tugineb 44 ainest koosnevale valideerimise andmebaasile, milles kasutati SI väärtusi $\geq$ 1,8 (vt punkt 6), millest LLNA: DA võimaldas õigesti kindlaks teha kõik 32 LLNA järgi sensibiliseerijat, kuid mis andis vale tulemuse kolme aine puhul 12st LLNA järgi mitte sensibiliseerivast ainest, mille SI oli 1,8–2,5 (st piiripealsed positiivsed tulemused) (10). Kuid kuna samu andmeid kasutati SI väärtuste kindlaksmääramiseks ja katsemeetodi ennustusvõime arvutamiseks, võivad esitatud tulemused viia tegeliku ennustusvõime ülehindamisele.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

6. LLNA: DA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis dreenivad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud

▼M3

rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kandeaine-kontrollrühmas leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 1,8 selleks, et katseaine kui naha võimaliku sensibiliseerija edasine hindamine oleks vajalik. Siin kirjeldatud meetod põhineb sellel, et bioluminestsentsi järgi mõõdetakse ATP sisaldust ja (kuna see korreleerub elusrakkude arvuga) (17) hinnatakse selle järgi paljunevate rakkude arvu suurenemist kõrvalesta dreenivates lümfisõlmedes (18, 19). Bioluminestsentsi meetodis kasutatakse ensüümi lutsiferaasi, mis katalüüsib valguse tekkimist ATPst ja lutsiferiinist vastavalt järgmisele reaktsioonile:

$$ATP + lutsiferiin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} oksülutsiferiin + AMP + PP_i + CO_2 + valgus$$

Eralduva valguse intensiivsus on lineaarselt seotud ATP kontsentratsiooniga ja seda mõõdetakse luminomeetriga. Lutsiferiini-lutsiferaasi katse on tundlik meetod ATP kvantitatiivseks mõõtmiseks ja seda kasutatakse paljudes meetodites (20).

KATSE KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. LLNA: DA valideerimisuuringud tehti ainult CBA/J-liini hiirtega, mida seepärast peetakse eelistatavaks liiniks (12, 13). Kasutatakse noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA: DA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

Pidamis- ja söötmistingimused

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (21), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Loomade ettevalmistamine

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

Annustamislahuste valmistamine

10. Tahke uuritav aine tuleb lahustada või suspendeerida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiiniseadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

▼M3

Usaldusväärsuse kontroll

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Mõned reguleerivad asutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA: DA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katsed, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA: DA immuunvastuse kokkupuutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) 1,8 korda või enam, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeksit üle 10 peetakse liiga suureks). Eelistatud positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (Chemical Abstracts Service (CASi) number 101-86-0) ja 25 % eugenool (CASi number 97-53-0) atsetooni-oliiviõli segus (4: 1, v/v). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st vähemalt kord kuus) tehakse LLNA: DAd ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA: DA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahemiku (vähem kui aasta) jooksul.

13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA: DA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija), ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.

14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katses saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatseni uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (22).

▼M3

15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4: 1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (23). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.

16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esile kutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:

— struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;

— teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;

— varasemad toetavad LLNA: DA andmed;

— toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja annusemäärad

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse nii nagu katserühma loomi, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.

18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes 2 ja 24 antud soovitustel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus. Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalis-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et kõrgeim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (24, 25). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).

19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada kõrgeimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitatavad kandeained on atsetoon-oliiviõli (4: 1, v/v), *N*,*N*-dimetüülformamiid, metüületüülketoon, propüleenglükool ja dimetüülsulfoksiid (6), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutuda vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdrofiilsed ained kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ega voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.

▼M3

20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainetega tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 33). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (22). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Üksikuid loomi käsitlevate andmete korrapärane kogumine annab loomade heaoluga seotud eelise, kuna võimaldab vältida korduvate uuringute tegemist, mis oleks hädavajalik, kui uuritavate ainete tulemusi, mis algselt on kogutud ühel viisil (näiteks loomade andmete ühendamisega), peaks reguleeriv asutus hiljem vaatlema teiste nõuete alusel (näiteks üksikloomade andmete põhjal).

Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA: DA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA: DA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % vedela katseaine puhul või kõrgeim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.

22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA: DA põhikatse, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse kehakaal enne katset ja enne katse lõppu (8. päev). Iga hiire kumbagi kõrvalesta uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (25). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust), 7. päeval (24 tundi enne katse lõpetamist) ja 8. päeval. Lisaks võib 8. päeval mõõta kõrvalesta paksuse, milleks pärast looma humaanset surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (26, 27). LLNA: DA põhikatse jaoks valitud suurim annus on järgmine väiksem annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), mille puhul ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemäärast nahaärritust.

Tabel 1

Punetuse hinne

Nähud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2

▼M3

Nähud	Hinne
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta paksuse 25 % suurenemisele (26, 27) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (28, 29, 30, 31, 32, 33, 34). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (30, 31, 32, 33, 34).

24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA: DA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (35) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordinatsiooni kadu, värin ja krambid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuahmimine, räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1.–8. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes näitavad suure valu või kannatuste tunnuseid, tuleks humaanselt surmata (36).

Põhiuuringu katse ajakava

25. Katse ajakava on järgmine.

— *1. päev:* määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kummagi kõrvalesta välisküljele kantakse naatriumlaurüülsulfaadi (SLS) 1 % vesilahust, kasutades SLSi lahusesse kastetud pintslit ja kattes kogu kõrvalesta välisküljе nelja-viie pintslitõmbega. Üks tund pärast SLSiga töötlemist kantakse kummagi kõrvalesta välisküljele 25 µl sobivalt lahjendatud uuritavat ainet, üksnes kandeainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või hiljutine perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).

— *2., 3. ja 7. päev:* korratakse 1. päeval tehtud eeltöötlust SLSi 1 % vesilahusega ja uuritava aine pealekandmist.

— *4., 5. ja 6. päev:* loomi ei töödelda.

— *8. päev:* määratakse iga looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Ligikaudu 24–30 tundi pärast 7. päeval toimunud uuritava aine pealekandmise algust surmatakse loomad humaanselt. Igal hiirel lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta dreenivad lümfisõlmed ja töödeldakse eraldi iga hiire lümfisõlmi fosfaatpuhvriga soolalahuses. Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites (22). Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksusemõõtjaga või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga välja löödud tüki massi mõõtmisega).

▼M3

Rakususpensioonide valmistamine

26. Valmistatakse iga hiire mõlemalt küljelt välja lõigatud lümfisõlmerakkude üherakuline suspensioon, milleks lümfisõlmed pannakse kahe objektiklaasi vahele ja purustatakse klaaside kerge surumisega üksteise vastu. Pärast selle kontrollimist, kas kude on jaotunud õhukese kihina, eraldatakse objektiklaasid teineteisest. Mõlemal objektiklaasil olev kude suspendeeritakse fosfaatpuhvriga soolalahuses, milleks kumbagi objektiklaasi hoitakse kaldu Petri tassi kohal ja loputatakse puhverlahusega, kraapides samal ajal rakukaabitsaga kudet klaasi küljest lahti. Negatiivse kontrolli loomade lümfisõlmed on väiksed, seepärast on tähtis tegutseda ettevaatlikult, et vältida igasugust kõrvalist mõju SI väärtustele. Kokku tuleks mõlema objektiklaasi loputamiseks kasutada 1 ml fosfaatpuhvriga soolalahust. Lümfisõlmerakkude suspensioon Petri tassil tuleb rakukaabitsaga kergelt homogeniseerida. Seejärel võetakse mikropipetiga 20 µl alikvoot lümfisõlmerakkude suspensioonist, püüdes mitte võtta silmaga nähtavat membraani, ja segatakse siis 1,98 ml fosfaatpuhvriga soolalahusega, nii et kokku saadakse 2 ml proovi. Samal viisil valmistatakse siis teine 2 ml proov, nii et iga looma kohta saadakse kaks proovi.

Rakkude vohamise määramine (lümfotsüütide ATP-sisalduse mõõtmine)

27. Lümfisõlmede ATP-sisalduse suurenemine määratakse lutsiferiin-lutsiferaasi meetodiga, kasutades ATP mõõtmise komplekti, millega bioluminestsents määratakse suhtelistes luminestsentsi ühikutes (RLU). Katse tegemise aeg looma tapmisest kuni ATP-sisalduse mõõtmiseni peaks iga üksiku looma puhul olema ühesugune, umbes 30 minuti piires, kuna ATP-sisaldus pärast looma tapmist möödunud ajaga järk-järgult väheneb (12). Seega tuleks kogu tegevus kõrvalesta lümfisõlmede väljalõikamisest kuni ATP mõõtmiseni lõpetada 20 minuti jooksul vastavalt ettemääratud ajakavale, mis on kõikide loomade puhul ühesugune. ATP luminestsents tuleks mõõta kummaski 2 ml proovis, nii et kokku saadakse iga looma kohta kaks ATP mõõtmist. Seejärel määratakse kindlaks keskmine ATP luminestsents ja kasutatakse seda edasistes arvutustes (vt punkt 30).

TÄHELEPANEKUD

Kliinilised tähelepanekud

28. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmatakse valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitus (36).

Kehamass

29. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

TULEMUSTE ARVUTAMINE

30. Iga katserühma tulemused väljendatakse keskmise stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. SI leidmiseks jagatakse iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmine RLU hiire kohta lahusti-/kandeaine-kontrollrühma keskmise RLU-ga hiire kohta. Keskmine SI kandeaine-kontrollrühmade puhul on seega 1.

▼M3

31. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 1,8 (10). Kuid piiripealse tulemuse (SI väärtus vahemikus 1,8–2,5) positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõlalisust (2, 3, 37).

32. Kui SI on vahemikus 1,8–2,5, st tegemist on piiripealse positiivse tulemusega, võivad meetodi kasutajad võtta koos SI väärtusega arvesse lisateavet, nagu annuse-immuunvastuse sõltuvus, tõendid süsteemse toksilisuse või tugeva nahaärrituse kohta ja vajaduse korral statistilist olulisust, mis kinnitavad positiivset tulemust (10). Arvesse tuleks võtta ka uuritava aine mitmesuguseid omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibilisaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on üksikasjalikult arutatud mujal (4).

33. Andmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paariviisiline annuserühmade ja paralleelsete lahuse-/kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paariviisiliste võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikku dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalejätmisega (nn võõrväärtused).

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

34. Andmed tuleks kokku võtta tabeli vormis; tabelis esitatakse iga üksiklooma RLU väärtused, rühma keskmine suhte RLU/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse lahusti/kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

Katsearuanne

35. Katsearuandes esitatakse järgmine teave:

uuritavad kemikaalid ja kontrollkemikaalid:

— tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);

— füüsikaline laad ja füüsikalis-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);

— kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad;

lahusti/kandeaine:

— tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);

— kandeaine valiku põhjendus;

▼**M3**

katseloomad:

— CBA-liini hiirte allikas;

— loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;

— loomade arv ja vanus;

— loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

katsetingimused:

— ATP määramise komplekti tootja, partiinumber ja tootja esitatud kvaliteeditagamise/kvaliteedikontrolli andmed ATP määramise komplekti kohta;

— uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;

— annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);

— kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;

— toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);

— annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;

— toksilisuse mõõtmise meetodid;

— kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;

— kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi;

usaldusväärsuse kontroll:

— kokkuvõte viimase usaldusväärsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;

— katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja paralleelse negatiivse (lahusti/kandeaine) kontrolli andmed;

— kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriaruanne ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist;

tulemused:

— iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud surmamist; samuti iga katserühma keskväärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);

— iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;

— iga katselooma surmamise aeg ja tema proovidest ATP mõõtmise aeg;

— tabelina iga üksiku hiire RLU väärtused ja iga katserühma SI väärtused;

— iga katserühma RLU/hiire keskväärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused;

▼**M3**

— arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas;

— annuse-immuunvastuse sõltuvus;

— vajaduse korral statistilised analüüsid;

tulemuste arutelu:

— lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

KIRJANDUS

1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt http://www.oecd.org/env/testguidelines

2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985–997.

4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–333.

5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49–59.

6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf

7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258–273.

8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274–286.

9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249–257.

10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm

▼**M3**

11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf.

12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1–10.

13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11–26.

14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: http://www.oecd.org/env/testguidelines

15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90–96.

17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81–88.

18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127–132.

19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27–34.

20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346–370.

21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf

23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71–89.

24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13–31.

25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195–206.

29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.

30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.

31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm

36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Vt: http://www.oecd.org/env/testguidelines

37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563–79.

38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (38).

Võrdlusaine: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalis-keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusus soovitavas immuunvastuse tugevuse vahemikus.

Valenegatiiv: aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega.

Valepositiiv: aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeta.

Oht: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

Laboritevaheline reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu uuritavaid aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (38).

Laborisisene reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (38).

Võõrväärtus: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

Kvaliteedi tagamine: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korrast kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

Usaldusväärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (38).

Naha sensibiliseerimine: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontaktsensibiliseerimiseks.

Stimulatsiooniindeks (SI): arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

Uuritav aine (uuritav kemikaal): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M3

B.51. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÕLMEDE KATSE: BRDU-ELISA

SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Esialgne katsemeetod (B.42) naha sensibiliseerimise määramiseks hiirtel lokaalsete lümfisõlmede katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429) on läbi vaadatud (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42). LLNA valideerimise üksikasjad ja sellega seotud töö ülevaade on avaldatud (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). LLNA-meetodi järgi kasutatakse lümfotsüütide paljunemise määramiseks radioaktiivse isotoobiga märgistatud tümidiini või joodi ja seepärast ei saa katset kasutada, kui radioaktiivsete ühendite hankimine, kasutamine või kõrvaldamine tekitab probleeme. LLNA: BrdU-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs) on LLNA katse-eeskirja modifikatsioon, milles ei kasutata radioaktiivsust ja lümfotsüütide vohamise mõõtmiseks ELISA-põhise katsesüsteemiga kasutatakse radioaktiivselt märgistamata 5-bromo-2-desoksüuridiini (BrdU, Chemical Abstracts Service'i (CASi) nr 59-14-3). Katsemeetod LLNA: BrdU-ELISA on valideeritud ja läbi vaadatud ning rahvusvaheline sõltumatu teaduslik eksperdihinnangu komisjon soovitab seda, kuna leiab, et see sobib naha sensibiliseerumist põhjustavate ja mittepõhjustavate kemikaalide kindlakstegemiseks, arvestades teatavaid piiranguid (10, 11, 12). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Käesoleva lisa peatükis B.6 ja OECD katsejuhendis 406 kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (13). LLNAd (käesoleva lisa peatükk B.42, OECD katsejuhis 429) ja selle kahte radioaktiivsuse kasutamiseta versiooni, need on LLNA: BrdU-ELISA (käesoleva lisa peatükk B.51, OECD katsejuhis 442 B) ja LLNA: DA (käesoleva lisa peatükk B.50, OECD katsejuhis 442 A), tuleb eelistada meriseakatsetele peatükis B.6, OECD katsejuhis 406 (13), kuna nendega vähendatakse ja täiustatakse katseloomade kasutamist.

2. Nii nagu LLNA puhul, uuritakse LLNA: BrdU-ELISA katsetes naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Lisaks kõrvaldab võimalus määrata naha sensibiliseerijaid ilma DNA radioaktiivset märgist kasutamata tööalase kokkupuute radioaktiivsusega ja radioaktiivsete jäätmete probleemi. See omakorda võimaldab naha sensibiliseerijate määramiseks kasutada rohkem hiiri, millega võiks veelgi väheneda merisigade kasutamine (s.o peatükk B.6, OECD katsejuhis 406) selleks otstarbeks (13).

MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA: BrdU-ELISA on muudetud LLNA-meetod võimalike nahka sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks, millel on aga teatavad piirangud. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada LLNA või merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) asemel LLNA: BrdU-ELISAt, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist (10, 11). Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist.

▼M3

Selline teave sisaldab uuritava aine nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi, struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA: BrdU-ELISA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA: BrdU-ELISA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

5. LLNA: BrdU-ELISA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Sellega on siiski võimalik vähendada katseloomade kasutamist selleks otstarbeks, võrreldes merisigadega tehtavate katsetega (B.6, OECD katsejuhis 406) (13). Lisaks võimaldab LLNA: BrdU-ELISA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks, kuna erinevalt B.6st ja OECD katsejuhendist 406 ei eelda LLNA: BrdU-ELISA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioone. Samuti ei eelda LLNA: BrdU-ELISA adjuvandi kasutamist, nagu seda tehakse merisigadega tehtava maksimeerimiskatse puhul (käesoleva lisa peatükk B.6, 13). Seega vähendab LLNA: BrdU-ELISA loomade kannatusi. Hoolimata LLNA: BrdU-ELISA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 (13) kohaste katsetega võrreldes on teatud piirangud, mis võivad nõuda B.6 või OECD katsejuhendi 406 kohaste katsete (13) kasutamist (nt teatavate metallide katsetamine, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teatavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (6) (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42), uuritavate ainete lahustuvus). Lisaks võib teatavate kemikaaliklasside või ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivaid funktsionaalseid rühmi (15), olla vaja kasutada meriseakatseid (st B.6 või OECD katsejuhend 406 (13)). LLNA puhul kindlaks tehtud piiranguid (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42) on peetud kehtivateks ka LLNA: BrdU-ELISA puhul (10). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA: BrdU-ELISA olema kohaldatav igasuguste kemikaalide uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNA: BrdU-ELISAga saadavate tulemuste õigsust. Lisaks sellele tuleks kaaluda piiripealse positiivse tulemuse võimalust, kui stimulatsiooniindeksi (SI) väärtus tuleb vahemikku 1,6–1,9 (vt punktid 31–32). See tugineb 43 ainest koosnevale valideerimise andmebaasile, milles kasutati SI väärtusi $\geq$ 1,6 (vt punkt 6), millest LLNA: BrdU-ELISA võimaldas õigesti kindlaks teha kõik 32 LLNA järgi sensibiliseerijat, kuid mis andis vale tulemuse kahe aine puhul 11st LLNA järgi mitte sensibiliseerivast ainest, mille SI oli 1,6–1,9 (st piiripealsed positiivsed tulemused) (10). Kuid kuna samu andmeid kasutati SI väärtuste kindlaksmääramiseks ja katsemeetodi ennustusvõime arvutamiseks, võivad esitatud tulemused viia tegeliku ennustusvõime ülehindamisele.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

6. LLNA: BrdU-ELISA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis dreenivad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kandeaine-kontrollrühmas

▼M3

leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 1,6 selleks, et katseaine kui naha võimaliku sensibiliseerija edasine hindamine oleks vajalik. Siin kirjeldatud meetodid põhinevad BrdU-sisalduse mõõtmisel; selle meetodiga mõõdetakse vohavate rakkude arvu suurenemist kõrvalesta dreenivates lümfisõlmedes. BrdU on tümidiini analoog ja vohavad rakud kasutavad seda DNA sünteesil sarnaselt tümidiiniga. BrdU sisenemist DNAsse mõõdetakse ELISA abil, milles kasutatakse BrdU-spetsiifilist peroksidaasiga märgistatud antikeha. Substraadi lisamisel reageerib peroksidaas substraadiga ning tekib värviline reaktsioonisaadus, mille kogus mõõdetakse neeldumise järgi teataval lainepikkusel, kasutades mikrotiiterplaadi lugejat.

KATSE KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. LLNA: BrdU-ELISA valideerimisuuringud tehti ainult CBA/JN-liini hiirtega, mida seepärast peetakse eelistatavaks liiniks (10, 12). Kasutatakse noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA: BrdU-ELISA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

Pidamis- ja söötmistingimused

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (16), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Loomade ettevalmistamine

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

Annustamislahuste valmistamine

10. Tahke uuritav aine tuleb lahustada või suspendeerida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiiniseadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

Usaldusväärsuse kontroll

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Mõned regulatiivasutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA: BrdU-ELISA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katseid, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise positiivse

▼M3

kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA: BrdU-ELISA immuunvastuse kokkupuutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) 1,6 korda või enam, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeksit üle 14 peetakse liiga suureks). Eelistatud positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (CASi number 101-86-0) ja 25 % eugenool (CASi number 97-53-0) atsetooni-oliiviõli segus (4: 1, v/v). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st mitte enam kui kuue kuu järel) tehakse LLNA: BrdU-ELISAt ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA: BrdU-ELISA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahemiku (vähem kui aasta) jooksul.

13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA: BrdU-ELISA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija), ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.

14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katses saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatseni uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (17).

15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4: 1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (18). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.

▼M3

16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esile kutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:

— struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;

— teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;

— varasemad toetavad LLNA: BrdU-ELISA andmed;

— toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja annusemäärad

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse nii nagu katserühma loomi, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.

18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes 2 ja 19 antud soovitustel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus. Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogia-andmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalis-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et suurim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (19, 20 ja käesoleva lisa peatükk B.4). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).

19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada suurimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitatavad kandeained on atsetoon-oliiviõli (4: 1, v/v), *N*,*N*-dimetüülformamiid, metüületüülketoon, propüleenglükool ja dimetüülsulfoksiid (6), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutuda vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdrofiilsed uuritavad ained kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ega voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.

▼M3

20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainetega tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 33). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (17). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Üksikuid loomi käsitlevate andmete korrapärane kogumine annab loomade heaoluga seotud eelise, kuna võimaldab vältida korduvate uuringute tegemist, mis oleks hädavajalik, kui uuritavate ainete tulemusi, mis algselt on kogutud ühel viisil (näiteks loomade andmete ühendamisega), peaks reguleeriv asutus hiljem vaatlema teiste nõuete alusel (näiteks üksikloomade andmete põhjal).

Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA: BrdU-ELISA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA: BrdU-ELISA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % kontsentratsioon vedela katseaine puhul või suurim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.

22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA: BrdU-ELISA põhikatse, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse kehakaal enne katset ja enne katse lõppu (6. päev). Iga hiire kumbagi kõrva uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (20, ja käesoleva lisa peatükk B.4). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust) ja 6. päeval. Lisaks võib 6. päeval mõõta kõrva paksuse, milleks pärast looma humaanset surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (21, 22). LLNA: BrdU-ELISA põhikatse jaoks valitud suurim annus on järgmine väiksem annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), millel ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemäärast nahaärritust.

Tabel 1

Punetuse hinne

Nähud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2

▼M3

Nähud	Hinne
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta 25 % suurenemisele (21, 22) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (25, 26, 27, 28, 29).

24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA: BrdU-ELISA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (30) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordinatsiooni kadu, värin ja krambid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuahmimine, räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1. kuni 6. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes näitavad suure valu või kannatuste tunnuseid, tuleks humaanselt surmata (31).

Põhiuuringu katse ajakava

25. Katse ajakava on järgmine.

— *1. päev:* määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kummagi kõrva välisküljele kantakse 25 µl sobivalt lahjendatud uuritavat ainet, üksnes kandeainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).

— *2. ja 3. päev:* korratakse 1. päeval tehtud pealekandmist.

— *4. päev:* loomi ei töödelda.

— *5. päev:* hiire kõhukelmesse süstitakse 0,5 ml (5 mg hiire kohta) BrdU lahust (10 mg/ml).

— *6. päev:* määratakse iga looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Umbes 24 tundi pärast BrdU süsti surmatakse loomad humaanselt. Igal hiirel lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta dreenivad lümfisõlmed ja töödeldakse eraldi iga hiire lümfisõlmi fosfaatpuhvriga soolalahuses. Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites 17. Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksusemõõtjaga või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga välja löödud tüki massi mõõtmisega).

▼M3

Rakususpensioonide valmistamine

26. Valmistatakse iga looma mõlemalt poolelt välja lõigatud ühendatud lümfisõlmede üksikrakususpensioon, milleks rakud eraldatakse üksteisest ettevaatliku mehaanilise töötlemisega, filtrides läbi 200 μm avaga roostevabast terasest võrgu, või kasutatakse üksikrakususpensiooni valmistamiseks muud sobivat võtet (näiteks purustatakse lümfisõlmed ühekordselt kasutatava plastikuhmrinuiaga ja lastakse seejärel läbi nailonvõrgu avasuurusega nr 70). Lümfisõlmerakkude suspensiooni valmistamine on selle katse puhul otsustava tähtsusega ja metoodika iga kasutaja peaks eelnevalt omandama selle oskuse. Negatiivse kontrolli loomade lümfisõlmed on väiksed, seepärast on tähtis tegutseda ettevaatlikult, et vältida igasugust kõrvalist mõju SI väärtustele. Igal juhul tuleb lümfisõlmerakkude suspensiooni lõppruumala viia kindlaksmääratud optimeeritud ruumalani (ligikaudu 15 ml). Optimeeritud ruumala määratakse nii, et negatiivse kontrolli rühmas saavutataks keskmine optiline neeldumine (tihedus) vahemikus 0,1–0,2.

Rakkude vohamise määramine (BrdU sisalduse mõõtmine lümfotsüütide DNAs)

27. BrdU määratakse ELISA meetodiga, kasutades müügil olevat komplekti (näiteks Roche Applied Science, Mannheim, Saksamaa, kataloginumber 11 647 229 001). Lühidalt, 100 μl lümfisõlmerakkude suspensiooni kantakse kolme lamedapõhjalise mikrotiiterplaadi süvendisse. Lümfisõlmerakud fikseeritakse ja denatureeritakse ning lisatakse siis igasse süvendisse BdrU-vastaseid antikehi. Seejärel eemaldatakse BrdU-vastased antikehad pesemisega ja lisatakse substraadi lahus ning lastakse tekkida kromogeenil. Määratakse optiline neeldumine 370 nm juures võrdluslainepikkuse 492 nm suhtes. Kõigil juhtudel on katsetingimusi vaja optimeerida (vt punkt 26).

TÄHELEPANEKUD

Kliinilised tähelepanekud

28. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmatakse valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitus (31).

Kehamass

29. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

TULEMUSTE ARVUTAMINE

30. Iga katserühma tulemused väljendatakse keskmise stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. SI leidmiseks jagatakse iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmine BrdU-märgistusindeks hiire kohta lahusti-/kandeaine-kontrollrühma keskmise BrdU-märgistusindeksiga hiire kohta. Keskmine SI kandeaine-kontrollrühmade puhul on seega 1.

BrdU-märgistusindeks on määratletud järgmiselt:

$$\text{BrdU-märgistusindeks} = (ABS_{em} - \text{ABS tühikatse}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS tühikatse}_{ref}),$$

kus: em = emissioonlainepikkus ja ref = võrdluslainepikkus.

▼M3

31. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 1,6 (10). Kuid piiripealse tulemuse (SI väärtus vahemikus 1,6–1,9) positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/-kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõlalisust (3, 6, 32).

32. Kui SI on vahemikus 1,6–1,9, st tegemist on piiripealse positiivse tulemusega, võivad meetodi kasutajad võtta koos SI väärtusega arvesse sellist lisateavet nagu annuse-immuunvastuse sõltuvus, tõendid süsteemse toksilisuse või ülemäärase ärrituse kohta ja vajaduse korral statistilist olulisust, mis kinnitavad positiivset tulemust (10). Arvesse tuleks võtta ka uuritava aine mitmesuguseid omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibilisaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on arutatud üksikasjalikult viites 4.

33. Andmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paariviisiline annuserühmade ja paralleelsete lahuse-/kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paariviisiliste võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikku dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalejätmisega (nn võõrväärtused).

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

34. Andmed tuleks kokku võtta tabeli vormis; tabelis esitatakse iga üksiklooma BrdU-märgistusindeksi väärtused, rühma keskmine suhte BrdU-märgistusindeks/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse lahusti-/kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

Katsearuanne

35. Katsearuandes esitatakse järgmine teave:

uuritavad kemikaalid ja kontrollkemikaalid:

— tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);

— füüsikaline laad ja füüsikalis-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);

— kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad;

lahusti/kandeaine:

— tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);

— kandeaine valiku põhjendus.

▼M3

katseloomad:

— CBA-liini hiirte allikas;

— loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;

— loomade arv ja vanus;

— loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

katsetingimused:

— ELISA määramise komplekti tootja, partiinumber ja tootja esitatud kvaliteeditagamise/kvaliteedikontrolli andmed komplekti kohta (antikeha tundlikkus ja spetsiifilisus ning määramispiir);

— uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;

— annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);

— kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;

— toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);

— annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;

— toksilisuse mõõtmise meetodid;

— kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;

— kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi;

usaldusväärsuse kontroll:

— kokkuvõte viimase usaldusväärsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;

— katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja paralleelse negatiivse (lahusti/kandeaine) kontrolli andmed;

— kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriaruanne ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist;

tulemused:

— iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist; samuti iga katserühma keskväärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);

— iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;

— tabelina iga üksiku hiire BrdU-märgistusindeksi väärtused ja iga katserühma SI väärtused;

— iga katserühma BrdU-märgistusindeksi/hiire keskväärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused;

▼M3

— arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas;

— annuse-immuunvastuse sõltuvus;

— vajaduse korral statistilised analüüsid;

tulemuste arutelu:

— lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

KIRJANDUS

1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: http://www.oecd.org/env/testguidelines

2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985–997.

4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–33.

5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf

7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258–273.

8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274–286.

9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249–257.

10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm

▼**M3**

11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf

12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129–134.

13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: http://www.oecd.org/env/testguidelines

14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt:

http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf

18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: http://www.oecd.org/env/testguidelines

21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195–206.

24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

▼**M3**

26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491–506.

27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm.

31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Vt: http://www.oecd.org/env/testguidelines

32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563–79.

33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (33).

Võrdlusaine: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusus soovitavas mõju tugevuse vahemikus.

Valenegatiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega (33).

Valepositiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeta (33).

Oht: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

Laboritevaheline reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides sama ainet, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (33).

Laborisisene reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (33).

Võõrväärtus: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

Kvaliteedi tagamine: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korrast kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

Usaldusväärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (33).

Naha sensibiliseerimine: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontaktsensibiliseerimiseks.

Stimulatsiooniindeks (SI): arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

Uuritav aine (uuritav kemikaal): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4

B.52. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL – ÄGEDA MÜRGISUSE KLASSI MÄÄRAMISE MEETOD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 436 (2009). Esimene sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katsejuhend nr 403 võeti vastu 1981. aastal ja see on hiljem läbi vaadatud (vt käesoleva lisa peatükk B.2 (1)). Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse klassi (*Acute Toxic Class*, ATC) määramise meetodi koostamist (2, 3, 4) peeti asjakohaseks pärast läbivaadatud ägeda suukaudse mürgisusastme meetodi vastuvõtmist (käesoleva lisa peatükk B.1b) (5). Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse klassi määramise meetodi tulemuslikkuse tagantjärele hindamine näitas, et kõnealune meetod on sobiv kasutamiseks klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil (6). Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse klassi määramise meetod võimaldab kasutada kindlaksmääratud sihtkontsentratsioonide mitut etappi, et määrata uuritava kemikaali mürgisuse klass. Peamise näitajana kasutatakse letaalsust, kuid suurtes valudes, kannatustes, piinlevad või suremas olevad loomad tuleks kannatuste minimeerimiseks humaansel viisil surmata. Humaansete lõpetamiskriteeriumide suunised on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19 (7).

2. Käesoleva katsemeetodi kasutamise ja tõlgendamise suunised on esitatud sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katset käsitlevas juhenddokumendis nr 39 (8).

3. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud 1. liites ja juhenddokumendis nr 39 (8).

4. Katsemeetod annab teavet ohtlike omaduste kohta ning võimaldab reastada ja klassifitseerida uuritava kemikaali vastavalt ägedat mürgisust põhjustavate kemikaalide klassifitseerimist käsitlevale määrusele (EÜ) nr 1272/2008 (9). Kui on vajalikud LC_{50} punktväärtuste hinnangud või mõju kontsentratsioonist sõltuvuse analüüsid, on asjakohane kasutada käesoleva lisa peatükis B.2 (1) esitatud meetodit. Täpsemad suunised katsemeetodi valiku kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (8). Käesolev katsemeetod ei ole spetsiaalselt ette nähtud erimaterjalide, nagu vähe lahustuvad isomeetrilised või kiudmaterjalid või toodetud nanomaterjalid, uurimiseks.

LÄHTEKAALUTLUSED

5. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, sh tehtud uuringud, mille andmete abil oleks võimalik täiendava katse tegemisest loobuda, et minimeerida loomade kasutust. Teave, mis võib aidata valida katseks kõige sobivama liigi, liini, soo, kokkupuuteviisi ja sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalis-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta. Kontsentratsioone, mis eeldatavasti tekitavad söövitava ([1]) või tugevasti ärritava toime tõttu tugevat valu ja kannatusi, ei tohiks käesoleva katsemeetodiga katsetada (vt juhenddokument nr 39 (8)).

([1]) Söövitavuse hindamiseks võib kasutada eksperdiarvamust ja järgmisi tõendeid: inimeste ja loomadega saadud kogemused, olemasolevad (*in vitro*) andmed, näiteks käesoleva lisa peatükk B.40 (10), B.40a (11) või OECD katsejuhend nr 435 (12), pH-väärtused, teave samalaadsete kemikaalide kohta või mis tahes muud asjakohased andmed.

▼M4

KATSE PÕHIMÕTE

6. Katse seisneb selles, et astmelise meetodiga kogutakse neljatunnise kokkupuute jooksul uuritava kemikaali sissehingamisel tekkiva ägeda mürgisuse kohta piisavalt teavet aine klassifitseerimiseks. Konkreetse regulatiivse eesmärgi jaoks võib kasutada muid kokkupuute ajavahemikke. Igal ettenähtud kontsentratsiooni etapil tehakse katse kolme loomaga kummastki soost. Olenevalt loomade suremisest ja/või sellest, kas loomad on suremas, võib uuritava kemikaali ägeda mürgisuse hindamiseks piisata kahest etapist. Kui esitatakse tõendid, et üks sugu on tundlikum kui teine, võib katset jätkata ainult sellest soost loomadega, kumb on tundlikum. Järgmine etapp määratakse kindlaks eelmise etapi tulemusega, nii et

   a) lisakatseid ei ole vaja teha;

   b) katse tehakse kolme loomaga kummagi soo kohta või

   c) kuue sellest soost loomaga, kumb on tundlikum, s.o mürgisusklassi alampiiri hinnangud peaksid põhinema kuuel loomal uuritava kontsentratsiooni rühma kohta nende soost olenemata.

7. Suremas loomad või loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad raskete ja kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata; selliseid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhised prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhenddokumendis nr 19 (7).

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

8. Tuleks kasutada katseloomade enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud isendeid. Eelistatav loomaliik on rott; muude liikide kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

Loomade ettevalmistamine

9. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kokkupuute päeval peaksid loomad olema 8 kuni 12 nädala vanused noored täiskasvanud, kelle kehamass ei tohiks erineda rohkem kui ±20 % selliste samas vanuses ja samast soost loomade keskmisest kehamassist, keda kasutati varasemates kemikaaliga kokkupuute katsetes. Loomad valitakse juhuslikult ja märgistatakse individuaalselt. Loomi hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda. Loomad peaksid olema enne katset ka katseseadmetega lühikese aja vältel kohanenud, kuna sel viisil vähendatakse uude keskkonda viimisest põhjustatud stressi.

Pidamistingimused

10. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandeainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuude toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele ülearuseid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise

▼M4

minutimahtu. Kui on kättesaadavad üldandmed, mille kohaselt kõnealuseid muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, ei ole eelnev hoiutoruga kohanemine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokku puutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisöötasid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatus koguses kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

Inhalatsioonikambrid

11. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärki. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu erieesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuude kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhenddokumendis nr 39 (8).

KOKKUPUUTETINGIMUSED

Kontsentratsioonide manustamine

12. Soovitatakse kasutada fikseeritud neljatunnist kokkupuuteaega, arvestamata tasakaalustamisaega. Muu kestus võib olla vajalik erinõuete täitmiseks, kuid selle kasutamist tuleks uuringuprotokollis põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (8)). Kogukehakambris uuritava kemikaaliga kokku puutuvad loomad tuleks eraldi paigutada, et vältida puurikaaslaste karvkatte korrastamise tõttu selle suukaudset manustamist. Kokkupuute ajal ei tohiks loomi sööta. Kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal võib loomadele anda vett.

13. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsikalisest vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügroskoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist.

Osakeste suurusjaotus

14. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosoole, mille osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–4 μm ning geomeetriline standardhälve (σ_g) on 1,5–3,0 (8, 13, 14). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdihinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed võivad olla kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed, kiud ja hügroskoopsed materjalid (mille suurus hingamisteede niiskes keskkonnas suureneb) võivad olla suuremad.

▼M4

Uuritava kemikaali preparaat kandeaines

15. Selleks et tagada uuritava kemikaali vajalik kontsentratsioon õhus ja osakeste suurus, võib olla vaja kasutada kandeainet. Eelistatult tuleks kasutada vett. Aineosakesi võib töödelda mehaaniliselt, et saavutada osakeste soovitud suurusjaotus, kuid tuleks olla hoolikas, et uuritavat kemikaali mitte lagundada ega muuta. Kui mehaaniline töötlus (näiteks tugeval jahvatamisel hõõrdumisest tekkinud kõrge temperatuur) võib olla uuritava kemikaali koostist muutnud, tuleks uuritava kemikaali koostist analüüsiga kontrollida. Tuleks olla hoolikas, et vältida uuritava kemikaali saastamist. Ei ole vaja katsetada raskesti peenestuvat teralist materjali, mis on sihipäraselt valmistatud nii, et seda ei saaks sisse hingata. Materjali hõõrumisega tuleks tõendada, et teralise materjali käsitlemisel ei teki sissehingatavaid osakesi. Kui hõõrumiskatsel tekib sissehingatavaid osakesi, tuleks teha sissehingamisel mürgisust näitav katse.

Loomade kontrollrühm

16. Samaaegne negatiivne (puhtas õhus peetavate) loomade kontrollrühm ei ole vajalik. Kui katsekeskkonna loomiseks kasutatakse muud kandeainet kui vesi, tuleks kandeaine kontrollrühma kasutada ainult juhul, kui varasemad sissehingamisel avalduva mürgisuse andmed ei ole kättesaadavad. Kui kandeaines sisalduva uuritava kemikaali mürgisuse uuringus mürgisust ei leita, siis võib järeldada, et kandeaine ei ole katsetatud kontsentratsioonil mürgine, seega ei ole kandeaine kontrollrühm vajalik.

KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE

Kambri õhuvarustus

17. Igas kokkupuutekatses tuleks kambri õhuvarustust hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed vähemalt kord tunnis registreerida. Keskkonnas oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (või selle stabiilsuse) seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit keskkonna tekitamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Eraldi tuleks jälgida, et ainult nina kaudu kokkupuute uurimise kambris ei hingataks väljahingatud õhku uuesti sisse, kuna kokkupuutesüsteemi õhuvarustus ei ole piisav uuritavat kemikaali sisaldava õhu dünaamilise voo tagamiseks. On olemas metoodika, mille abil saab tõendada, et valitud katsetingimustes ei hingata väljahingatud õhku uuesti sisse (8, 15). Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid nõudeid ei ole võimalik täita, tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisisaldust mõõta.

Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus

18. Kambri temperatuur tuleks hoida 22 ± 3 °C juures. Loomade hingamistsooni suhtelist õhuniiskust tuleks nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu kokkupuute katsetes seirata ja registreerida vähemalt kolm korda kuni neljatunnise katse jooksul ning iga tund lühema katse puhul. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu (näiteks veepõhise segu uurimisel) ei pruugi see olla saavutatav või mõõdetav.

▼M4

Uuritav kemikaal – nimikontsentratsioon

19. Kui see on võimalik, tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambrisüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katsesüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

Uuritav kemikaal – tegelik kontsentratsioon

20. Tegelik kontsentratsioon on proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon loomade hingamistsoonis inhalatsioonikambris. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik saada kas spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetriline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vähelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud konkreetse kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilist analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutuda vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelistatult lenduvas olekus) kordusanalüüse korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase. Katseprotokollis tuleks esitada siht-, nimi- ja tegelikud kontsentratsioonid, kuid letaalse kontsentratsiooni arvutamiseks kasutatakse statistilises analüüsis ainult tegelikke kontsentratsioone.

21. Võimaluse korral tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsidest või muud hinnangud. Kuigi uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määratlemise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).

22. Kokkupuutekeskkonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna ja seiratakse pidevalt ja/või pisteliselt, olenevalt analüüsimeetodist. Kui kasutatakse pistelist proovivõttu, tuleks neljatunnise uuringu vältel võtta kambrikeskkonnast proove vähemalt kaks korda. Kui see ei ole piiratud õhuvarustuse või väikeste kontsentratsioonide tõttu võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Kui proovide analüüsimisel saadakse oluliselt erinevad tulemused, tuleks järgmiste uuritavate kontsentratsioonide puhul võtta kokkupuute kohta neli proovi. Kambrist võetud proovide kontsentratsioon ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui ±10 % gaaside ja aurude puhul või ±20 % vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg (t_{95}) ja see registreerida. Kokkupuute kestus on aeg, mille vältel lisatakse uuritavat kemikaali ja seejuures arvestatakse t_{95} saavutamiseks vajalikku ajavahemikku. Juhendid t_{95} hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (8).

▼M4

23. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskkonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoode või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambris erinevalt, nii et tuleks valida vähemalt üks uuritav aine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, siis tuleks kirja panna kogu segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (8).

Uuritav kemikaal – osakeste suurusjaotus

24. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt kaks korda iga neljatunnise kokkupuute ajal, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada muud seadet, näiteks gravimeetrilist filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (8)). Kui uuringu varajases etapis on võimalik tõendada võrdväärsust, siis võib loobuda täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katsest ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik kokkupuudet korrata. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool, või kui auru keskkonnas tuvastatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga (vt punkt 14).

KATSE KÄIK

Põhikatse

25. Igal etapil kasutatakse kolme looma kummagi soo kohta või kuut looma sellest soost, mis on tundlikum. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseliigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Lähtedoosina kasutatavaks kontsentratsiooniks valitakse üks nelja kindlaksmääratud taseme hulgast ning lähtekontsentratsioon peaks olema selline, mis tekitab kõige tõenäolisemalt mürgistuse mõnele loomadest, kellele doos manustatakse. Gaaside, aurude ja aerosoolide katseskeemid (mis on lisatud 2.–4. liites) seisnevad katsetamises CLP-määruse ((EÜ) nr 1272/2008) 1.–4. kategooria piirväärtustega (9) gaaside puhul (100, 500, 2 500, 20 000 ppm nelja tunni jooksul) (2. liide), aurude puhul (0,5, 2, 10, 20 mg / l nelja tunni jooksul) (3. liide) ja aerosoolide puhul (0,05, 0,5, 1,5 mg / l nelja tunni jooksul (4. liide). 5. kategooria, mida ei ole määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) rakendatud, on seotud vastavaid piirkontsentratsioone ületavate kontsentratsioonidega. Iga lähtekontsentratsiooni puhul kohaldatakse vastavat katsetamise skeemi. Humaanselt surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseprotseduuris vastavalt nooltega näidatud suunale, kuni on võimalik määrata kategooria.

26. Ajavahemik katserühmade kokkupuutekatsete vahel määratakse kindlaks mürgistusnähtude alguse, kestuse ja raskuse järgi. Loomade kokkupuude järgmise kontsentratsiooniga tuleks edasi lükata seni, kuni eelmises katses kasutatud loomade ellujäämises võib olla mõistlikkuse piires veendunud. Enne iga järgmise kontsentratsiooniga kokkupuudet soovitatakse oodata kolm või neli päeva, et oleks võimalik jälgida hiljem avalduvat mürgisust. Ajavahemikku võib vajaduse korral korrigeerida, nt ebaselge vastuse puhul.

▼M4

Piirsisalduskatse

27. Piirsisalduskatset kasutatakse, kui uuritav kemikaal ei ole teadaolevalt või eeldatavalt mürgine, s.o mürgistus tekib ainult regulatiivse piirkontsentratsiooni ületamise puhul. Teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta võib saada varem katsetatud samalaadseid aineid või samalaadseid segusid käsitlevatest andmetest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisainete keemilist laadi ja sisaldust. Kui teavet mürgisuse kohta on vähe või ei ole üldse või kui uuritav kemikaal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse (täpsemad suunised on esitatud juhenddokumendis nr 39 (8)).

28. Tavalise meetodi kasutamisel viiakse kolm looma kummagi soo kohta või kuus looma sellest soost, kumb on tundlikum, kokkupuutesse vastavalt kontsentratsiooniga 20 000 ppm gaaside puhul, 20 mg/l aurude korral ja 5 mg/l tolmu/udu puhul (kui see on saavutatav), mis on käesoleva katsemeetodi piirsisalduskatse. Aerosooli katsetamisel peaks olema peamine eesmärk saavutada sissehingamiseks sobiv osakese suurus (st osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on 1–4 μm). See on enamiku uuritavate kemikaalide puhul võimalik kontsentratsioonil 2 mg/l. Aerosooli katsetamist rohkem kui 2 mg/l juures tuleks proovida ainult juhul, kui sissehingamiseks sobiv osakeste suurus on võimalik saavutada (vt juhenddokument nr 39 (8)). Ühtse ülemaailmse kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemi (GHS) (16) kohaselt ei ole katsetamine suuremal kui piirkontsentratsioonil loomade heaolu kaalutlustel soovitatav. GHSi 5. kategooria (16) kohast katsetamist, mida ei ole määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) rakendatud, tuleks kaaluda ainult juhul, kui on suur tõenäosus, et kõnealuse katse tulemused on otseselt seotud inimeste tervise kaitsega, ning seda tuleks sel juhul uuringuprotokollis põhjendada. Plahvatusohtliku uuritava kemikaali puhul tuleks olla hoolikas, et vältida plahvatust võimaldavaid tingimusi. Loomade tarbetu kasutamise vältimiseks tuleks enne piirsisalduskatset teha proovikatse ilma loomadeta, et tagada piirsisalduskatse jaoks vajalike kambritingimuste saavutamine.

VAATLUSED

29. Loomi tuleks kokkupuute ajal sageli kliiniliselt jälgida. Pärast kokkupuudet tuleks kliinilised vaatlused korraldada vähemalt kaks korda kokkupuutepäeva jooksul või, kui loomade reageerimine kokkupuutele seda nõuab, ka sagedamini, ja seejärel vähemalt kord päevas kokku 14 päeva jooksul. Vaatlemise ajavahemiku kestus ei ole kindlaks määratud; see tuleks määrata kliiniliste nähtude laadi, tekkimisaja ja taastumisperioodi pikkuse alusel. Mürgistusnähtude ilmumise ja kadumise aeg on oluline eelkõige juhul, kui mürgistusnähtudel on kalduvus avalduda viitmõjuna. Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed. Suremas olevad loomad ja loomad, kellel esinevad tugeva valu ja/või püsivad suurte kannatuste tunnused, tuleks loomade heaolu kaalutlustel humaansel viisil surmata. Uuringute tegemisel tuleks olla hoolikas, et mürgistuse kliinilisi tunnuseid kindlaks tehes vältida kokkupuutest põhjustatud esialgse halva välimuse ja hingamise ajutiste muutuste pidamist töötlemisega seotud mõjudeks. Arvesse tuleks võtta humaansete lõpetamiskriteeriumide juhisdokumendis esitatud põhimõtteid ja kriteeriume (7). Kui loomad surmatakse humaansetel kaalutlustel või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

▼M4

30. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, hingamise, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Võimaluse korral tuleks eristada lokaalset ja süsteemset mõju ja need registreerida. Tuleb pöörata tähelepanu värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma esinemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega.

Kehamassid

31. Iga looma kehamass tuleks registreerida üks kord kohanemise perioodi vältel, kokkupuute päeval enne kokkupuudet (päev 0) ning vähemalt päevadel 1, 3 ja 7 (ning seejärel iga nädal) ja surma või eutanaasia korral, kui see toimub pärast päeva 1. Kehamass on teatavasti mürgistuse oluline näitaja ja seega tuleks täpselt jälgida loomi, kelle kehamass väheneb püsivalt > 20 % võrreldes uuringueelsete näitajatega. Ellujäänud loomad kaalutakse ja surmatakse humaansel viisil kokkupuutejärgsel ajavahemikul.

Patoloogia

32. Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kes surmati eutanaasiaga või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse täielikult. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritähelepanu hingamisteede mis tahes muutustele.

33. Uuringu tõlgendusväärtuse laiendamiseks võib kaaluda uuringu kavasse eelnevalt ettenähtud täiendavate uuringute lisamist, nagu ellujäänud rottide kopsude kaalu mõõtmine ja/või hingamisteede ärrituse tõendamine hingamisteede mikroskoobiga vaatlemise teel. Uurida võib ka organeid, milles 24 tundi või kauem elanud loomadel esineb patoloogilisi muutusi, samuti organeid, mis teadaolevalt või eeldatavasti võivad olla kahjustatud. Kogu hingamistee mikroskoobiuuring võib anda kasulikku teavet veega reageeriva uuritava kemikaali, näiteks happe või hügroskoopse kemikaali kohta.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

34. Tuleks esitada andmed iga üksiku looma kehamassi ja lahkamistulemuste kohta. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguleiud.

▼M4

Katseprotokoll

35. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseloomad ja pidamistingimused

— Puuritingimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline niiskus, valgustusperiood ja sööt.

— Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus.

— Loomade arv, vanus ja sugu.

— Randomiseerimismeetod.

— Üksikandmed sööda ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas).

— Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

Uuritav kemikaal

— Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).

— Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

Kandeaine

— Kandeaine kasutamise põhjendus ja valiku põhjendus (kui kandeainena ei kasutata vett).

— Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

Inhalatsioonikamber

— Inhalatsioonikambri kirjeldus, sh selle mõõtmed ja maht.

— Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.

— Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.

— Õhuallikas ja kambrisse suunatud / kambrist välja lastud õhu töötlemiseks ning konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.

— Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kaliibrimisel kasutatud meetodid.

— Rõhuerinevus (positiivne või negatiivne).

— Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine süsteemis (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Katsekeskkonna ajaline homogeensus/stabiilsus.

— Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonna proovide võtmine kambris.

— Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuutepordi kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Teave hapniku ja süsinikdioksiidi sisalduse mõõtmiseks kasutatud seadmete kohta, vajaduse korral.

▼**M4**

— Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg (t_{95}).

— Kogu kambris oleva õhu vahetuste arv tunnis.

— Mõõteseadmed (vajaduse korral).

Andmed kokkupuute kohta

— Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.

— Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambrisse suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).

— Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsoonist kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse analüüsida iga faasi eraldi.

— Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikutes (mg/l, mg/m^3 jne), kontsentratsioonid mahuühikutes (ppm, ppb jne) võib teatada sulgudes.

— Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetriline standardhälve (σ_g) ning nende arvutusmeetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

Katsetingimused

— Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed mis tahes meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks. Kui mehaanilised protsessid võivad olla muutnud uuritava kemikaali koostist, tuleb lisada nende analüüside tulemused, mille abil kontrolliti uuritava kemikaali koostist.

— Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).

— Kasutatud keemilise analüüsi meetodi ja selle valideerimise üksikasjad (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsimisel).

— Katsekontsentratsioonide valiku põhjendus.

Tulemused

— Tabelitena andmed katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.

— Tabelitena andmed kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni kohta.

— Tabelid osakeste suurusjaotuse andmete kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja σ_g arvutamine.

— Tabelid iga looma reageerimise andmete (st mürgistustunnustega loomad, kaasa arvatud suremus, mõjude laad, raskus ja kestus) ja annusemäärade kohta.

— Uuringupäevadel registreeritud iga looma kehamass; surmakuupäev ja -aeg, kui loom sureb enne plaanijärgset eutanaasiat, mürgistusnähtude tekke aeg ja pöörduvus iga looma puhul.

▼M4

— Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

— CLP-määruse kohane kategooria klassifikatsioon ja LC_{50} piirväärtus.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine

— Eritähelepanu tuleks pöörata nende meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.

— Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda küsimust, kas osakeste suurus oli sobiv sissehingamiseks, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.

— Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõlalisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.

— Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).

— Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (7) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaansel viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.

KIRJANDUS

1) Käesoleva lisa peatükk B.2 „Äge mürgisus (sissehingamisel)”.

2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243–254.

3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537–549.

4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129–134.

5) Käesoleva lisa peatükk B.1b „Äge suukaudne mürgisus – ägeda mürgisuse klassi määramise meetod”.

6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼**M4**

10) Käesoleva lisa peatükk B.40 „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmine”.

11) Käesoleva lisa peatükk B.40a „Nahasöövituskatse *in vitro*: katse inimnaha mudeliga”.

12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.

15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4

2. liide

Toimimine gaasi iga lähtekontsentratsiooni juures (ppm nelja tunni kohta)

Üldised märkused ([1])

Selles liites esitatud vastavad katseskeemid selgitavad, kuidas tuleb toimida iga lähtekontsentratsiooni juures.

2.a liide: lähtekontsentratsioon on 100 ppm.

2.b liide: lähtekontsentratsioon on 500 ppm.

2.c liide: lähtekontsentratsioon on 2 500 ppm.

2.d liide: lähtekontsentratsioon on 20 000 ppm.

Humaansel viisil surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseskeemis vastavalt nooltega näidatud suunale.

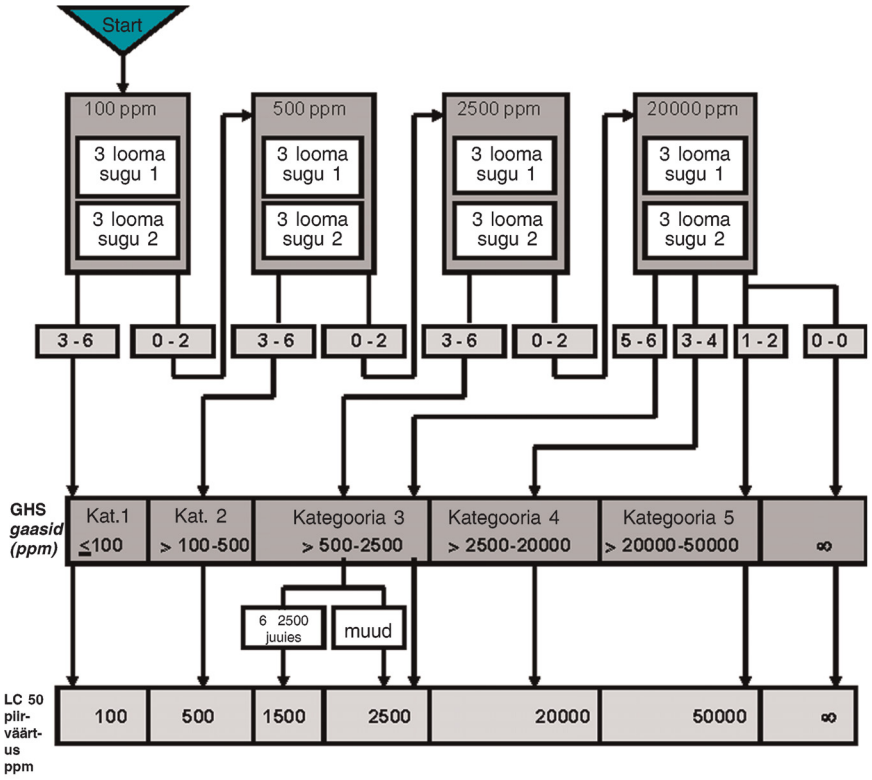
([1]) Järgmistes tabelites viidatakse GHSile (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem). ELi vaste on määrus (EÜ) nr 1272/2008. Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse puhul ei rakendata määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) kategooriat 5.

▼M4

2.a liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 100 ppm 4 tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

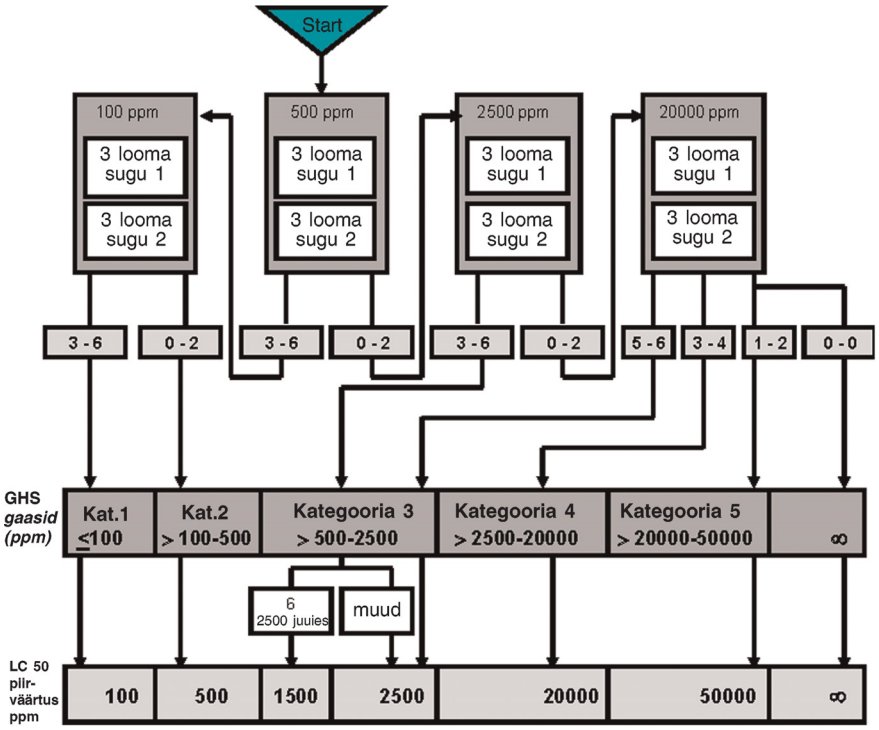
— Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

2.b liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 500 ppm 4 tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

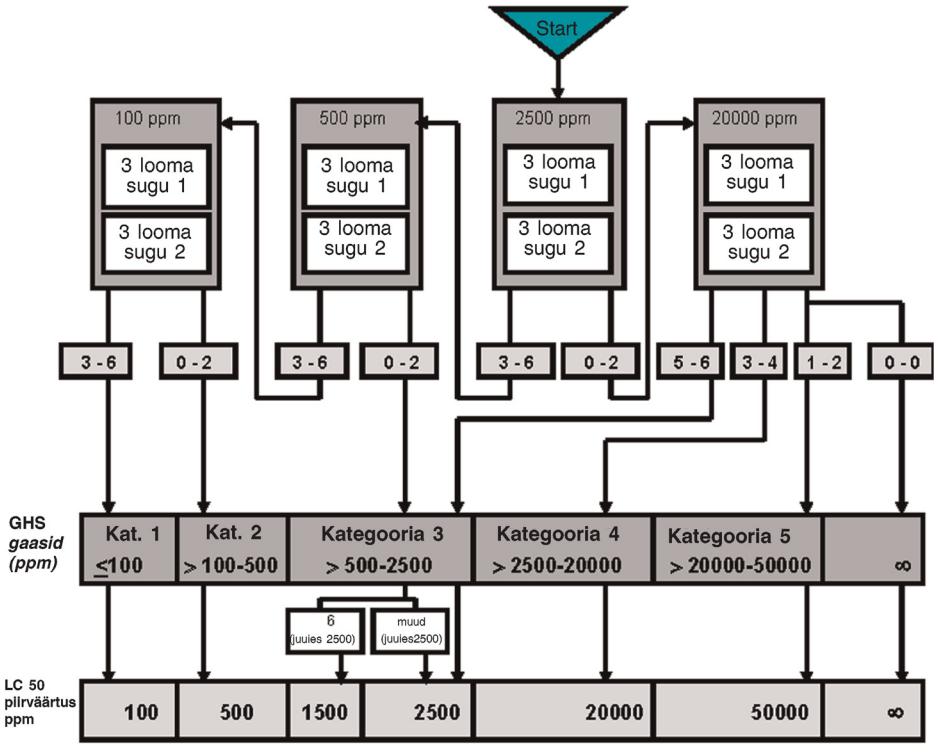
— Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8).

▼M4

2.c liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 2 500 ppm 4 tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0–6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

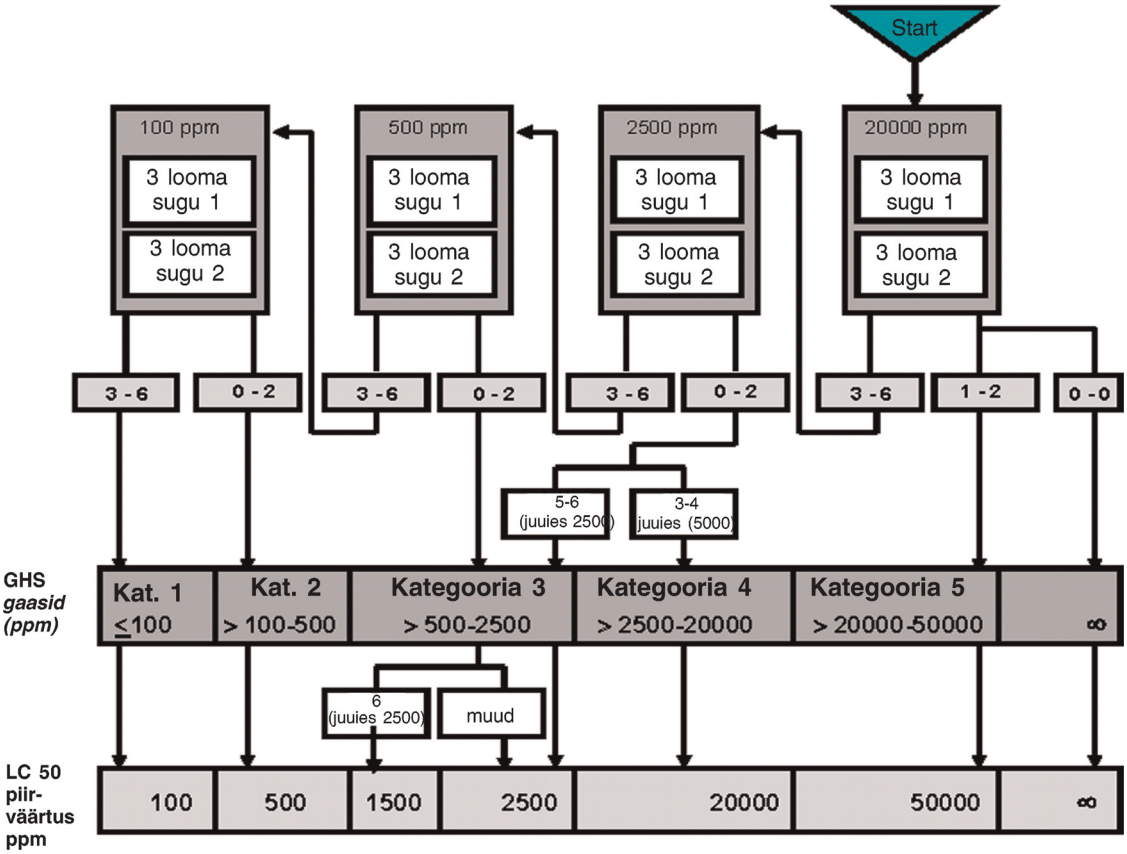
— Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

2.d liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 20 000 ppm 4 tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

— Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

3. liide

Toimimine auru iga lähtekontsentratsiooni juures (mg/l nelja tunni kohta)

Üldised märkused ([1])

Selles liites esitatud vastavad katseskeemid selgitavad, kuidas tuleb toimida iga lähtekontsentratsiooni juures.

3.a liide: lähtekontsentratsioon on 0,5 mg/l.

3.b liide: lähtekontsentratsioon on 2,0 mg/l.

3.c liide: lähtekontsentratsioon on 10 mg/l.

3.d liide: lähtekontsentratsioon on 20 mg/l.

Humaansel viisil surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseskeemis vastavalt nooltega näidatud suunale.

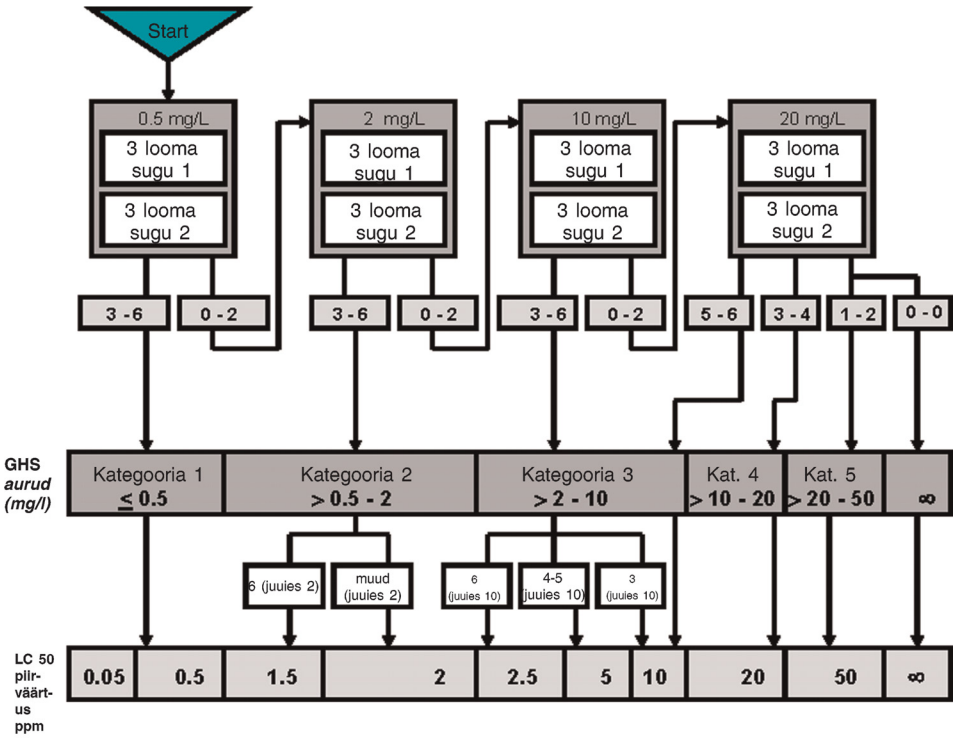
([1]) Järgmistes tabelites viidatakse GHSile (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem). ELi vaste on määrus (EÜ) nr 1272/2008. Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse puhul ei rakendata määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) kategooriat 5.

▼M4

3.a liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 0,5 mg/l 4 tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

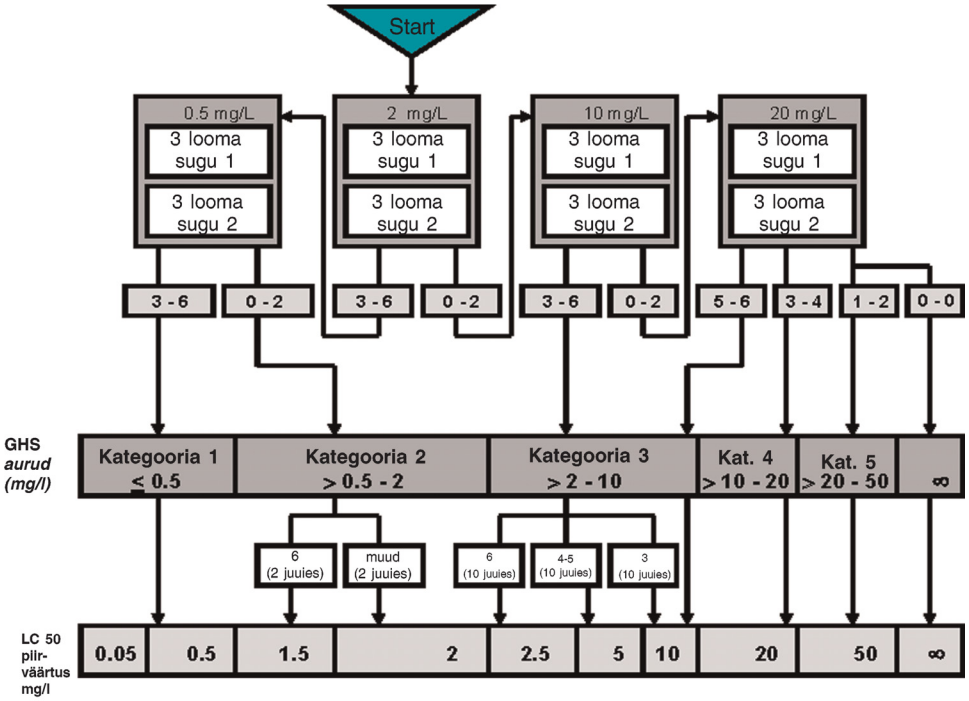
— Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

3.b liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 2 mg/l 4 tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0–6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

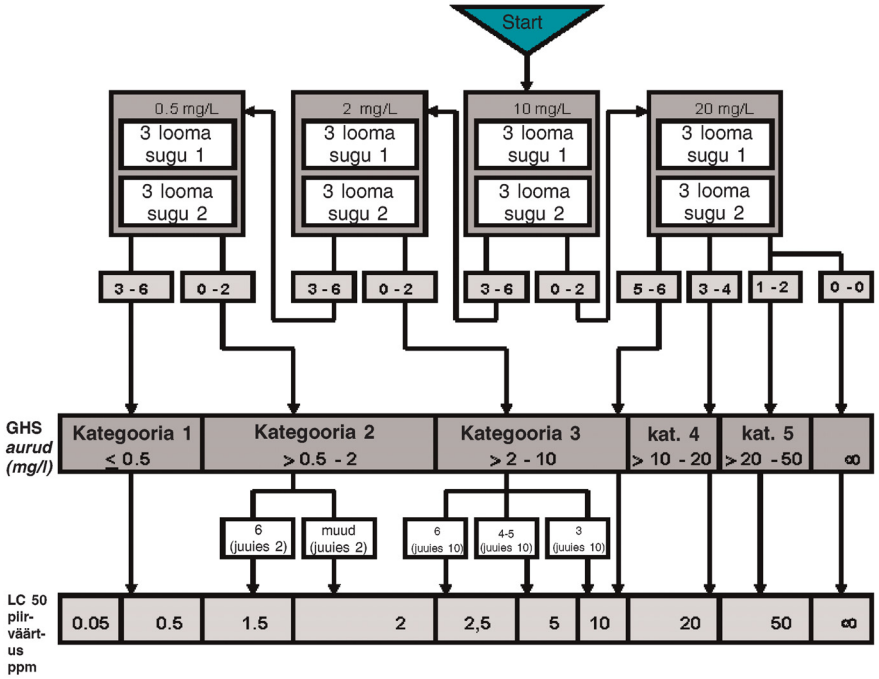
— Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

3.c liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 10 mg/l 4 tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0–6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

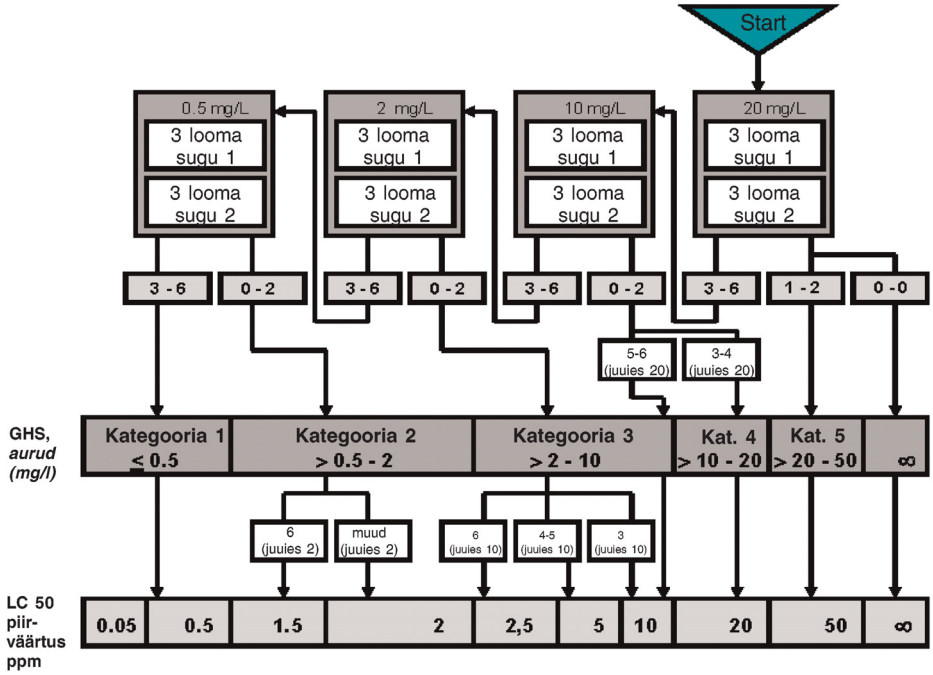
— Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

3.d liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 20 mg/l 4 tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

— Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

4. liide

Toimimine aerosooli iga lähtekontsentratsiooni juures (mg/l nelja tunni kohta)

Üldised märkused ([1])

Selles liites esitatud vastavad katseskeemid selgitavad, kuidas tuleb toimida iga lähtekontsentratsiooni juures.

4.a liide: lähtekontsentratsioon on 0,05 mg/l.

4.b liide: lähtekontsentratsioon on 0,5 mg/l.

4.c liide: lähtekontsentratsioon on 1 mg/l.

4.d liide: lähtekontsentratsioon on 5 mg/l.

Humaansel viisil surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseskeemis vastavalt nooltega näidatud suunale.

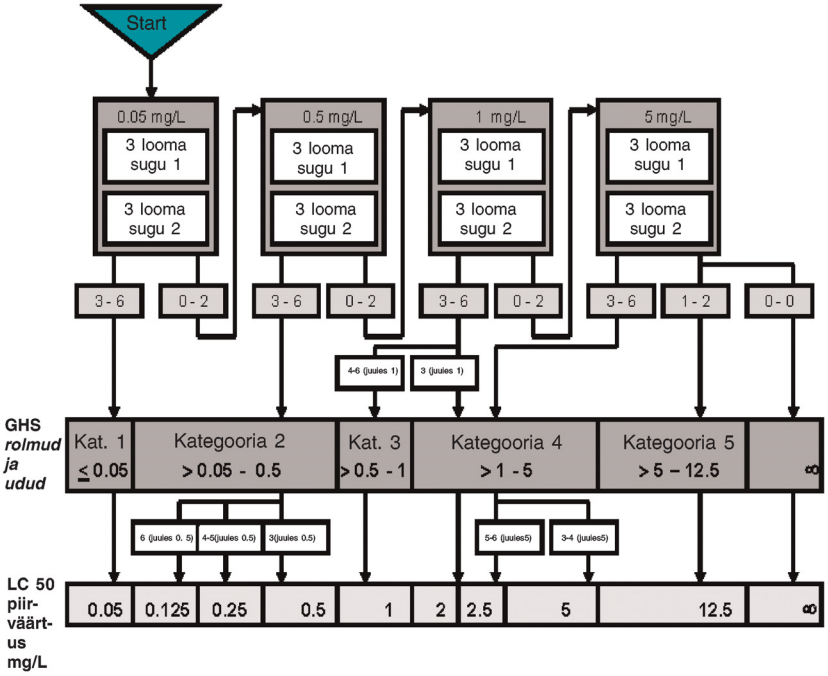
([1]) Järgmistes tabelites viidatakse GHSile (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem). ELi vaste on määrus (EÜ) nr 1272/2008. Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse puhul ei rakendata määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) kategooriat 5.

▼M4

4.a liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 0,05 mg/l 4 tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

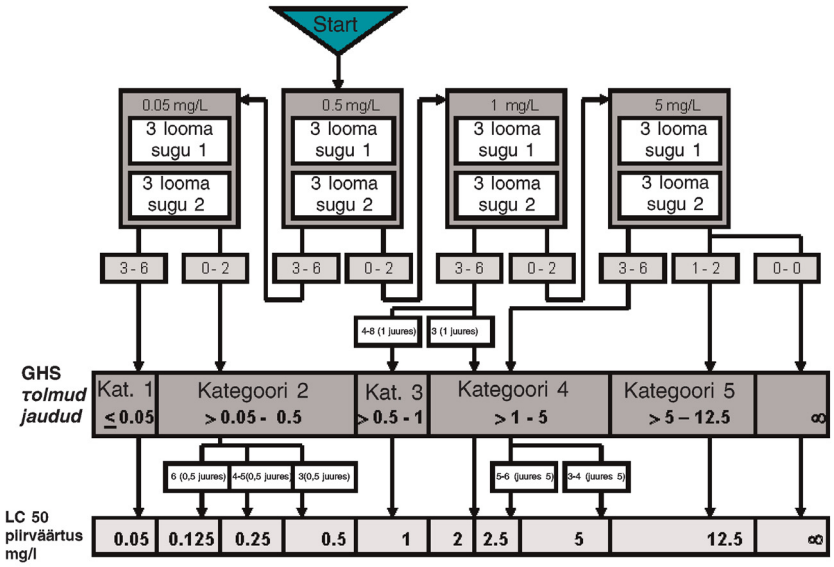
— Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

4.b liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aerosoolide puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 0,5 mg/l 4 tunni jooksul



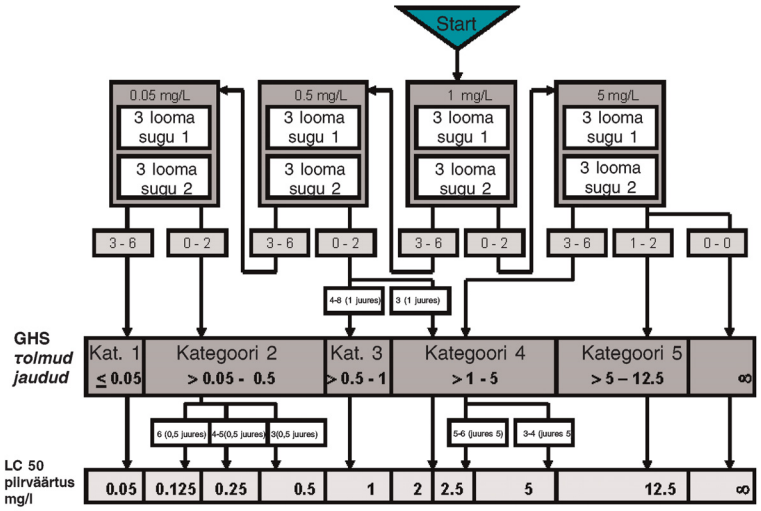
— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
— 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.
— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
— ∞: klassifitseerimata.
— Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4 h: vt juhenddokument 39 (8).

▼M4

4.c liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aerosoolide puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 1 mg/l 4 tunni jooksul



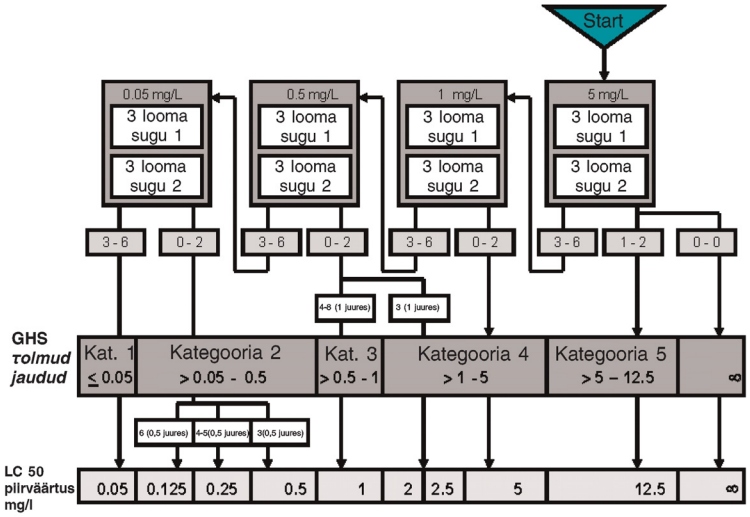
— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
— 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.
— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
— ∞: klassifitseerimata.
— Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4 h: vt juhenddokument 39 (8).

▼M4

4.d liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aerosoolide puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 5 mg/l 4tunni jooksul



— 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.

— 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.

— GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.

— ∞: klassifitseerimata.

— Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4 h: vt juhenddokument 39 (8).”

▼M5

B.53. **ARENGUHÄIREID PÕHJUSTAVA NEUROTOKSILISUSE UURING**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 426 (2007). OECD paljunemisvõimet kahjustava ja arengut mõjutava toksilisuse töörühma koosolekul Kopenhaagenis 1995. aasta juunis arutati, kas on vaja ajakohastada olemasolevaid OECD katsejuhendeid paljunemisvõimet kahjustava ja arengut mõjutava toksilisuse määramiseks ja töötada välja uusi katsejuhendeid seni veel hõlmamata näitajate määramiseks (1). Töörühm soovitas koostada katsejuhendi arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse määramiseks, võttes aluseks USA keskkonnakaitseameti (EPA) katsejuhendi, mis on hiljem läbi vaadatud (2). 1996. aasta juunis toimus Kopenhaagenis teine arutelu selleks, et koostada sekretariaadile suunised uue, arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse juhendi peamiste küsimuste kohta, sealhulgas näiteks loomaliigi valimise, doseerimisperioodi, hinnatavate näitajate ja tulemuste hindamise kriteeriumide kohta. Ameerika Ühendriikide suunised neurotoksilisuse riski hindamiseks avaldati 1998. aastal (3). Oktoobris 2000 toimusid üksteise järel OECD ekspertide koosolek ja ILSI (International Life Science Institute) riskihindamise seminar ning Tokyos peeti 2005. aastal ekspertide koosolek. Koosolekutel arutati seoses käesoleva katsemeetodi väljatöötamisega seniste katsejuhenditega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi ning koosolekute soovitusi (4, 5, 6, 7). Lisateavet käesoleva katsemeetodi kasutamise, tulemuste tõlgendamise ja kasutatud terminite kohta võib leida OECD juhenddokumendist nr 43 „Reproduktiivtoksilisuse määramine ja hindamine” (8) ning nr 20 „Neurotoksilisuse määramine” (9).

LÄHTEKAALUTLUSED

2. Paljud kemikaalid avaldavad inimesele ja muudele liikidele arenguhäireid põhjustavat neurotoksilist mõju (10, 11, 12, 13). Kemikaali toksiliste omaduste hindamisel võib olla vaja määrata arenguhäireid põhjustava neurotoksilise mõju võimalikkust. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu eesmärk on koguda andmeid mõju kohta, mida emakasisene või sünnijärgne kokkupuude kemikaaliga avaldab järglaste arenevale närvisüsteemile; andmeid kogutakse doosi ja toime vahelise sõltuvuse, võimalike funktsionaalsete ja morfoloogiliste mõjude kohta.

3. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu võib teha eraldi või reproduktiivtoksilisuse ja/või neurotoksilisuse uuringu raames (nt katsejuhendid B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) või lisaks sünnieelseid arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringule (nt katsejuhend B.31 (17)). Kui arenguhäireid põhjustavat neurotoksilisust uuritakse muu uuringu raames, on tingimata vaja säilitada kummagi uuringutüübi terviklikkus. Kõik katsed peaksid olema kooskõlas kohaldatavate õigusaktidega või valitsuse ja institutsiooniliste suunistega katseloomade kasutamise kohta teadusuuringutes (nt 18).

4. Katselabor vaatab enne uuringu tegemist läbi ja võtab arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta. Selline teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali nimetus ja struktuur, füüsikalis-keemilised omadused, muud sama kemikaaliga *in vitro* või *in vivo* tehtud mürgisuskatsete tulemused, struktuurilt sarnaste ainete toksikoloogilised andmed ning kemikaali eeldatav(ad) kasutusala(d). Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks, ja aitab valida sobivat lähtedoosi.

▼M5

KATSE PÕHIMÕTE

5. Katsekemikaali manustatakse loomadele tiinuse ja imetamise ajal. Katseid tehakse emasloomadega, et hinnata mõju tiinus- ja imetamisperioodil, ning katsed võivad hõlmata ka võrdleva teabe (emasloomad *vs*. nende järglased) hankimist. Järglased valitakse neurotoksilisuse hindamiseks pesakondadest juhuslikult. Hindamine hõlmab vaatlusi, et teha kindlaks suuri neuroloogilisi ja käitumuslikke kõrvalekaldeid; seejuures hinnatakse füüsilist arengut, käitumise ontogeneesi, motoorset aktiivsust, motoorseid ja sensoorseid funktsioone, õppimist ja mälu; samuti hinnatakse aju massi ja neuropatoloogiat sünnijärgse arengu käigus ja pärast täiskasvanuikka jõudmist.

6. Kui katsemeetodi alusel tehakse eraldi uuring, võib igas rühmas kasutada täiendavaid loomi, et teha konkreetseid neurokäitumuslikke uuringuid, neuropatoloogia, neurokeemia või elektrofüsioloogia uuringuid, millega võidakse täiendada käesoleva katsemeetodi kasutamisega saadavaid andmeid (16, 19, 20, 21). Täiendavad uuringud võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused, oodatav mõju või toimemehhanism viitavad mingile konkreetsele neurotoksilisuse tüübile. Nende täiendavate katsete jaoks võib kasutada emasloomi ja poegi. Lisaks võib kasutada ka *ex vivo* või *in vitro* katseid, kui need katsed ei muuda *in vivo* katsete usaldusväärsust.

KATSE ETTEVALMISTAMINE

Loomaliigi valimine

7. Eelistatud liigiks on rott; sobivuse korral võib kasutada muid liike. Siiski tuleb silmas pidada, et lootelise ja sünnijärgse arengu kohta käesolevas katsemeetodis osutatud päevad kehtivad rottide sagedamini kasutatavate liinide puhul, ning kui kasutatakse muud loomaliiki või ebatavalist rotiliini, siis tuleb valida võrreldavad päevad. Muu liigi kasutamist tuleks põhjendada toksikoloogiliste, farmakokineetiliste ja/või muude andmete alusel. Põhjenduses tuleks viidata olemasolevatele liigispetsiifilise käitumise sünnijärgse arengu neuroloogia ja neuropatoloogia hinnangutele. Kui varasemad katsed andsid muret tekitavaid tulemusi, tuleks kaaluda sama liigi/aretusliini kasutamist. Kuna erinevate liinide rottidel on erinevad omadused, tuleks tõendada, et kasutamiseks valitud liini rotid on piisava sigivuse ja reageerimisvõimega. Kui arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringus kasutatakse muud liiki, tuleb dokumentidega tõendada selle liigi tundlikkus ja saadavate tulemuste usaldusväärsus.

Pidamis- ja söötmistingimused

8. Temperatuur katseloomade ruumis peab olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Valgustustsükli võib enne paaritamist ja uuringu kestuse ajaks muuta ka vastupidiseks, et funktsionaalseid ja käitumise näitajaid saaks hinnata pimedal perioodil (punase valguse juures), kui loomad on tavaliselt aktiivsed (22). Kui valguse ja pimeduse vaheldumise tsüklit muudetakse, tuleb ette näha vajalik kohanemisperiood, et loomad kohaneksid uue tsükliga. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut koos piiramatu hulga joogiveega. Katseprotokollis esitatakse sööda ja vee tüüp ning nii sööda kui ka vee kohta tuleks teha saasteainete analüüs.

▼M5

9. Loomi võib hoida puurides eraldi või väikestes, samast soost loomade rühmadena. Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud puurides. Pärast toimunud paarituse tõendamist või hiljemalt tiinuse 15. päeval tuleks paaritatud loomad paigutada eraldi poegimispuuridesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Paaritunud emasloomadele antakse poegimisaja lähenemisel sobivad ja kindlaksmääratud pesaehitusmaterjalid. On hästi teada, et ebasobiv kohtlemine või stress tiinuse ajal võib teha kahju, sealhulgas põhjustada loote surma enne poegimist või loote ja vastsündinud poegade arengu häireid. Selleks, et ära hoida loote surma kemikaali manustamisega mitte seotud tegurite mõjul, tuleb loomi tiinuse ajal kohelda hoolikalt ja vältida välistest teguritest, näiteks mürast, tingitud stressi.

Loomade ettevalmistamine

10. Tuleks kasutada terveid loomi, kes on aklimatiseerunud laboratooriumi tingimustega ning keda ei ole varem katses kasutatud, välja arvatud juhul, kui uuring toimub muu uuringu raames (vt punkt 3). Katseloomad tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Igale loomale tuleb määrata ja märkida kordumatu identifitseerimisnumber. Kõikide katserühmade loomad peaksid olema võimalikult ühesuguse kaalu ja vanusega, ning need peaksid olema kasutatava liigi ja liini tavapärases vahemikus. Iga doosimäära juures tuleks kasutada noori täiskasvanud poegimata emasloomi. Õdesid ja vendi ei tohiks lasta omavahel paarituda ja tuleb hoolitseda, et seda ei juhtuks. Tiinuse 0-päevaks (tiinestumispäevaks, *gestation day*, GD) loetakse päev, millal märgati spermat tupes ja/või vaginaalkorki. Kui tarnijalt ostetakse teadaoleva tiinestumispäevaga tiined loomad, nähakse ette sobiv kohanemisaeg (nt 2–3 päeva). Paaritatud emasloomad jagatakse erapooletul viisil ja võimalikult ühtlaselt kontrollrühmadesse ja katserühmadesse (nt soovitatavalt stratifitseeritud juhusliku meetodiga, et tagada rühmade vahel loomade ühtlane jaotus, näiteks kehamassi järgi). Sama isaslooma poolt viljastatud emasloomad tuleks jaotada võrdselt eri rühmade vahel.

KATSE KORRALDUS

Loomade arv ja sugu

11. Tiinete emasloomade arv igas kontrollrühmas ja katserühmas, mille liikmed puutuvad kokku uuritava kemikaaliga, peaks olema piisav, et sünniks piisav arv järglasi neurotoksilisuse hindamiseks. Iga doosimäära puhul soovitatakse kasutada kokku 20 pesakonda. Kui iga sellise rühma kohta saavutatakse nõutav pesakondade arv, on lubatud paralleelsed ja vahelduvate rühmadega manustamiskavad; paralleelproovide arvessevõtmiseks kasutatakse sobivaid statistilisi mudeleid.

12. Hiljemalt 4. sünnijärgsel päeval (*post-natal day*, PND 4) (sünni päev on PND 0) tuleks kõikide pesakondade suurus ühtlustada; selleks surmatakse juhusliku valiku alusel liigsed pojad, et kõikide pesakondade suurus oleks võrdne (23). Pesakonna suurus ei tohiks ületada keskmist pesakonna suurust kasutatava näriliste liini puhul (8–12). Pesakonda tuleks alles jätta võrdne arv isas- ja emasloomi, kuivõrd see on võimalik. Poegade selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi põhjal, ei ole sobiv. Pärast pesakondade standardimist (liigsete poegade surmamist) ja enne edasiste funktsionaalsete näitajate määramist tuleks kõik võõrutuseelsete või võõrutusjärgsete katsete jaoks ettenähtud pesakonna liikmed varustada individuaalse kordumatu märgisega, kasutades sobivat humaanset meetodit (nt 24).

▼M5

Loomade jagamine rühmadesse funktsionaalsete ja käitumuslike testide tegemiseks, aju massi määramiseks ja neuropatoloogiliseks hindamiseks

13. Meetodis lubatakse kasutada eri lähenemisviise selleks, et jagada loomad rühmadesse, kes puutuvad kemikaaliga kokku *in utero* ja imetamise kaudu ning kellele tehakse funktsionaalsed ja käitumuslikud testid, kellel jälgitakse suguküpsuse saabumist ja määratakse aju massi ning keda hinnatakse neuropatoloogia seisukohast (25). Vajaduse korral võib üksikjuhtudel määrata muid käitumuslikke neuroloogilisi funktsioone (nt sotsiaalset käitumist), uurida neurokeemilisi või neuropatoloogilisi aspekte, kui sellega ei kahjustata algselt nõutud testide usaldusväärsust.

14. Pojad valitakse igast doosirühmast ja iga näitaja hindamiseks alates 4. sünnijärgsest päevast (PND 4). Poegade valimine rühmadesse peaks toimuma nii, et iga doosirühma iga pesakonna kummastki soost pojad oleksid võimalikult ühtlaselt esindatud kõikides testides. Motoorse aktiivsuse katsetes tuleks poegade hulgast ühtesid ja samu isas- ja emasloomapaare uurida igas võõrutuseelses vanuses (vt punkt 35). Kõikide muude käitumuslike testide tegemiseks võib määrata sama või erineva isaslooma ja emaslooma paari. Võõrutatud poegade ja täiskasvanud loomade kognitiivse talitluse hindamisel võib osutuda vajalikuks määrata rühmadesse erinevad pojad, et vältida tulemuste sõltumist erineva vanuse või eelneva õppimise mõjust (26, 27). Võõrutamise ajal (PND 21) võib pojad, keda katsete tegemiseks ei valita, humaansel viisil surmata. Kõik muudatused poegade rühmadesse jagamisel tuleks katseprotokollis fikseerida. Statistiline mõõtmisühik peaks olema pesakond (või poeginud emasloom), aga mitte poeg.

15. Poegade jagamiseks rühmadesse, millega tehakse võõrutuseelseid ja -järgseid vaatlusi, kognitiivseid katseid, patoloogiavaatlusi jne, on mitmeid võimalusi (vt üldkava (joonis 1) ja rühmadesse jagamise näide (1. liide)). Soovitatav minimaalne loomade arv igas doosirühmas võõrutuseelsete ja -järgsete uuringute puhul on järgmine:

Kliinilised vaatlused ja kehamass	Kõik loomad
Üksikasjalikud kliinilised vaatlused	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Aju mass (pärast fikseerimist) PND 11–22	10/sugu (1/pesakond)
Aju mass (fikseerimata) ~ PND 70	10/sugu (1/pesakond)
Neuropatoloogia (fikseerimine immersiooni või perfusiooniga) PND 11–22	10/sugu (1/pesakond)
Neuropatoloogia (fikseerimine perfusiooniga) ~ PND 70	10/sugu (1/pesakond)
Suguküpsuse saabumine	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Muud olulised arengunäitajad (soovi korral)	Kõik loomad
Käitumise ontogenees	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Motoorne aktiivsus	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Motoorne ja sensoorne funktsioon	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Õppimine ja mälu	10/sugu [a] (1/pesakond)

[a] Kognitiivse talitluse katsed: tundlikkusest olenevalt tuleb kaaluda suurema arvu loomade kasutamist, nt kuni 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast (loomade rühmadeks jagamine, vt 1. liide) (täiendavad juhised valimi suuruse kohta on esitatud OECD juhenddokumendis 43 (8)).

▼M5

Dooside manustamine

16. Tuleks kasutada vähemalt kolme doosimäära ja näha ette paralleelsed kontrollrühmad. Doosimäärad tuleks määrata nii, et tekkivad toksilised mõjud tugevneksid järk-järgult. Kui seda ei piira kemikaali füüsikalis-keemilised või bioloogilised omadused, tuleks kõrgeim doosimäär valida nii, et tiinel emasloomal ilmneksid mürgistusnähud (nt kliinilised sümptomid, kehamassi väiksem (mitte üle 10 %) suurenemine ja/või tõendid mürgisuse kohta sihtorganile, mis ei luba doosi piirmäära suurendada). Suurima doosi piiriks võib teatavate eranditega olla 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Näiteks võib inimese oodatava kokkupuute ulatus sundida kasutama suuremat doosi. Teise võimalusena tuleks teha prooviuuring või esialgsed doosivahemiku määramise katsed, et leida suurim doos, mis põhjustaks tiinel emasloomal vaid minimaalseid mürgistusnähtusid. Kui standardse arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringu või prooviuuringuga on näidatud, et uuritav kemikaal põhjustab arenguhäireid, peaks kõrgeim doosimäär olema selline, mis ei oleks järglaste jaoks väga mürgine, näiteks ei põhjusta järglaste surma juba emaüsas või kohe pärast sündi, samuti ei põhjusta selliseid väärarenguid, mis ei võimalda mõistlikult hinnata arenguhäireid põhjustavat neurotoksilisust. Väikseim doos tuleks valida nii, et see ei põhjustaks mingeid toksilisuse sümptomeid ei tiinel emasloomal ega järglastel, samuti mitte neurotoksilisuse sümptomeid. Doosimäärade alanev järjestus tuleks valida nii, et saaks näidata toime sõltuvust doosist ja leida täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldava doosi (*No-Observed-Adverse Effect Level*, NOAEL) või jälgitava toime piiri lähedase doosi, mis lubaks määrata võrdlusdoosi. Kahe- või neljakordsed vahemikud on sageli optimaalsed alanevate doosimäärade kehtestamisel ja neljanda doosirühma lisamine on sageli eelistatav väga suurte doosidevaheliste vahemike (nt üle kümne korra) puhul.

17. Doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad andmed mürgisuse kohta ning ka lisateavet uuritava kemikaali või samalaadse aine metabolismi ja toksiko-kineetika kohta. Kõnealune teave aitab ehk ka näidata, et dooside manustamise režiim on valitud õigesti. Dooside otsest manustamist vastsündinud poegadele tuleks kaaluda kokkupuudet ja farmakokineetikat käsitleva teabe põhjal (28, 29). Enne dooside otsese manustamise uuringu tegemist tuleks hoolikalt kaaluda eeliseid ja puudusi (30).

18. Paralleelseks kontrollrühmaks peaks olema kahjutut ainet saav kontrollrühm või kandeainet saav kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kõigile loomadele tuleks kehamassist lähtudes manustada ühesugune kogus kas uuritavat kemikaali või kandeainet. Kui dooside manustamise hõlbustamiseks kasutatakse kandeainet või muud lisaainet, tuleks pöörata tähelepanu järgmistele aspektidele: kandeaine mõju uuritava kemikaali imendumisele, jaotumisele kehas, metabolismile või peetumisele; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võib muuta selle toksilisi omadusi, ning mõju loomade sööda- või veetarbimisele või toitumusele. Kandeainel ei tohiks olla mõju, mis võiks häirida uuringu tulemuste tõlgendamist; samuti ei tohiks kandeaine neurotoksilisuse tõttu põhjustada käitumishäireid, mõjutada paljunemist või embrüo arengut. Uudse kandeaine puhul tuleks lisaks kandeaine kontrollrühmale kasutada veel võltskontrollrühma. Kontrollrühma(de) loomi tuleks kohelda nii nagu katserühma loomi.

▼M5

Dooside manustamine

19. Uuritavat kemikaali või kandeainet tuleks manustada viisil, mis on kõige asjakohasem inimese kokkupuute puhul, võttes arvesse metabolismiga ja katselooma kehas jaotumisega seotud teavet. Manustamisviis on tavaliselt suukaudne (näiteks sundsöötmine sondiga või sööda või joogivee kaudu), kuid kasutada võib ka muid manustamisviise (nt naha kaudu, sissehingamise teel), sõltuvalt kemikaali omadustest ning eeldatavast või teadaolevast kokkupuuteteest inimese puhul (täiendavad juhised on esitatud juhenddokumendis 43 (8)). Valitud manustamisviisi tuleks põhjendada. Uuritavat kemikaali tuleks manustada igal päeval ligikaudu samal ajal.

20. Iga looma doos peaks tavaliselt põhinema looma kõige viimasel individuaalselt kindlaksmääratud kehamassil. Tiinuse viimasel kolmandikul tuleks doosi määramisega olla siiski ettevaatlik. Kui emasloomadel, kellele manustati kemikaali, avalduvad liigse mürgistuse sümptomid, tuleks need loomad humaanselt tappa.

21. Uuritavat kemikaali või kandeainet tuleks paaritatud emasloomadele manustada vähemalt kord päevas alates loodete implantatsioonist (GD 6) kogu imetamise aja jooksul (kuni PND 21), nii et pojad puutuksid kemikaaliga kokku närvisüsteemi sünnieelse ja -järgse arengu jooksul. Nii dooside manustamise algust kui ka kestust ja sagedust võib muuta, kui tõendid osutavad, et katse teistsugune korraldus võiks inimese kokkupuudet arvestades olla asjakohasem. Muu liigi puhul tuleks dooside manustamise kestust kohandada, et tagada kokkupuude kemikaaliga aju arengu kõikidel varastel järkudel (s.o järkudel, mis vastavad inimaju sünnieelsele ja varasele sünnijärgsele kasvule). Dooside manustamine võib alata kohe tiinuse algusest (GD 0), kuigi tuleks silmas pidada võimalust, et kemikaal võib põhjustada embrüo hukkumise juba enne implantatsiooni. Manustamise alustamisega GD 6-st saaks seda riski vältida, kuid arengujärgud GD 0 — GD 6 jäävad siis kemikaaliga mõjutamata. Kui labor ostab teadaoleva tiinestumispäevaga tiineid loomi, on raske alustada dooside manustamist GD 0-st ja seega oleks hea päev alustamiseks GD 6. Katselabor peaks kehtestama dooside manustamise korra vastavalt uuritava kemikaali mõju käsitlevale asjakohasele teabele, varasematele kogemustele ja logistilistele kaalutlustele; see võib hõlmata dooside manustamist ka pärast võõrutamist. Doosi ei manustata poegimise päeval sellistele loomadele, kes ei ole veel kõiki järglasi sünnitanud. Üldiselt eeldatakse, et järglaste kokkupuude kemikaaliga toimub emapiima kaudu; kuid kui järglaste jätkuva kokkupuute kohta puuduvad tõendid, tuleks kaaluda kemikaali manustamist otse poegadele. Tõendeid järglaste katkematu kokkupuute kohta võib leida näiteks farmakokineetilisest teabest, teabest mürgisuse kohta järglastele või biomarkerite muutustest (28).

VAATLUSED

Emasloomade jälgimine

22. Kõiki emasloomi tuleks hoolikalt vaadelda vähemalt kord päevas, et hinnata nende terviseseisundit, sealhulgas haigestumust ja suremust.

23. Dooside manustamise ja vaatluste perioodil tuleks korrapäraselt teha üksikasjalikke kliinilisi vaatlusi (vähemalt kahel korral poegimiseelsel manustamisperioodil ja kahel korral imetamisaegsel manustamisperioodil), kasutades vähemalt kümmet emaslooma iga doosimäära puhul. Loomi peaksid väljaspool kodupuuri vaatlema väljaõppinud spetsialistid, kes ei tea, et manustatakse kemikaali, ja kasutavad standarditud korda, et vähendada loomade stressi ja vaatleja erapoolikuse mõju ning saavutada vaatlejate arvamuste võimalikult hea kooskõla. Võimaluse korral on soovitatav, et ühe uuringu puhul teeks vaatlusi sama spetsialist.

▼M5

24. Täheldatud sümptomid tuleks registreerida. Võimaluse korral tuleks registreerida ka täheldatud sümptomite intensiivsus. Kliinilised vaatlused peaksid hõlmama vähemalt järgmist: naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine ja/või suu kaudu hingamine, kõik urineerimise või roojamisega seotud ebatavalised sümptomid).

25. Kõik kehaasendi, aktiivsuse astme (nt standardala vähenenud või suurenenud uurimine) ning liigutuste koordinatsiooni muutused tuleks samuti üles märkida. Muutused kõnnakus (nt taarumine, ataksia), kehaasendis (nt küürus selg) ning reageerimises kättevõtmisele, mahapanemisele või muudele keskkonna stiimulitele ning klooniliste või tooniliste liigutuste, krampide või värinate esinemine, stereotüübid (nt ülemäärane karvkatte eest hoolitsemine, ebatavalised pealiigutused, korduv tiirutamine) või veider käitumine (nt hammustamine või enda ülemäärane lakkumine, enesevigastamine, tagurpidi kõndimine, häälitsemine) või agressiivsus tuleks registreerida.

26. Toksilisuse märgid tuleks üles märkida koos ilmnemise päeva, kellaaja, sümptomite raskusastme ja kestusega.

27. Dooside manustamise ajal tuleks loomi kogu uuringu kestel kaaluda vähemalt üks kord nädalas, sünnituse päeval või selle läheduses ja päeval PND 21 (võõrutamine). Emasloomade sundsöötmise uuringute puhul tuleks loomi kaaluda vähemalt kaks korda nädalas. Doose tuleks sobivaks kohandada vastavalt igale kehamassi määramise tulemusele. Sööda tarbimist tuleks tiinuse ja imetamise ajal mõõta vähemalt iga nädal. Kui kemikaali manustatakse joogivee kaudu, tuleks vee tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas.

Järglaste jälgimine

28. Kõiki järglasi tuleks hoolikalt vaadelda vähemalt kord päevas, et teha kindlaks mürgistusnähud, haigestumus ja suremus.

29. Dooside manustamise ja vaatluste ajal tuleks teha järglaste üksikasjalikke kliinilisi vaatlusi. Järglasi (vähemalt üks loom kummastki soost ja igast pesakonnast) peaksid vaatlema väljaõppinud spetsialistid, kes ei tea, et manustatakse kemikaali, ja kasutavad standarditud korda, et vähendada vaatleja erapoolikuse mõju ning saavutada vaatlejate arvamuste võimalikult hea kooskõla. Võimaluse korral on soovitatav, et vaatlusi teeks sama spetsialist. Iga vaadeldava arengujärgu kohta tuleks jälgida vähemalt punktides 24 ja 25 kirjeldatud näitajaid.

30. Kõik järglaskonnas ilmnevad toksilisuse märgid tuleks üles märkida koos ilmnemise päeva, kellaaja, sümptomite raskusastme ja kestusega.

Füüsilised ja arengut iseloomustavad näitajad

31. Võõrutuseelse arengu näitajate (kõrvalesta tipu eemaldumine peast, silmade avanemine, lõikehammaste ilmumine) muutused korreleeruvad hästi kehamassiga (30, 31). Kehamass võib olla parim füüsilise arengu taseme näitaja. Arengu põhinäitajate mõõtmist soovitatakse seepärast ainult siis, kui on olemas varasemad tõendid selle kohta, et kõnealused näitajad annavad täiendavat teavet. Kõnealuste näitajate hindamise ajakava on esitatud tabelis 1. Sõltuvalt oodatavast mõjust ja esialgsete mõõtmiste tulemustest võib olla soovitatav lisada täiendavaid aegu või teha mõõtmisi muudes arengustaadiumides.

▼M5

32. Füüsilise arengu hindamise korral on soovitatav kasutada paaritusjärgset, mitte sünnijärgset vanust (33). Kui poegadega tehakse katseid võõrutamise päeval, on soovitatav teha katsed enne võõrutushetke, et vältida võõrutamisega seotud stressi segavat mõju. Katseid ei tuleks teha ka kahel võõrutamisjärgsel päeval.

Tabel 1

Füüsiliste ja arengut iseloomustavate näitajate ning funktsionaalsete või käitumuslike näitajate hindamise ajakava [a]

Vanusejärgud / Näitajad	Võõrutuseelne [b]	Noorukiiga [b]	Noored täiskasvanud [b]
Füüsilised ja arengut iseloomustavad näitajad			
Kehamass ja kliinilised vaatlused	iga nädal [c]	vähemalt iga kahe nädala tagant	vähemalt iga kahe nädala tagant
Aju mass	PND 22 [d]		katse lõpetamisel
Neuropatoloogia	PND 22 [d]		katse lõpetamisel
Suguküpsuse saabumine	—	vajaduse korral	—
Muud arengunäitajad [e]	vajaduse korral	—	—
Funktsionaalsed või käitumuslikud näitajad			
Käitumise ontogenees	vähemalt kaks mõõtmist		
Motoorne aktiivsus (sh harjumine)	1–3 korda [f]	—	üks kord
Motoorne ja sensoorne funktsioon	—	üks kord	üks kord
Õppimine ja mälu	—	üks kord	üks kord

[a] Selles tabelis on esitatud minimaalne mõõtmiskordade arv. Sõltuvalt oodatavast mõjust ja esialgsete mõõtmiste tulemustest võib olla soovitatav lisada täiendavaid aegu (näiteks vanad loomad) või teha mõõtmisi muudes arengustaadiumides.

[b] Poegadega ei soovitata teha katseid kahel võõrutusjärgsel päeval (vt punkt 32). Soovitatav vanus noorloomadega katsete tegemiseks on järgmine: õppimine ja mälu — PND 25 ± 2; motoorne ja sensoorne funktsioon — PND 25 ± 2. Soovitatav vanus katsete tegemiseks noorte täiskasvanutega on PND 60–70.

[c] Poegadele dooside otse manustamise korral tuleks kehamassi mõõta vähemalt kaks korda nädalas, et kohandada doose vastavalt kehamassi kiirele suurenemisele.

[d] Aju massi ja neuropatoloogiat võib hinnata varasemal ajal (nt PND 11), kui see on sobiv (vt punkt 39).

[e] Muid arengu näitajaid lisaks kehamassile (nt silmade avanemine) tuleb registreerida sündmuse toimumise ajal (vt punkt 31).

[f] Vt punkt 35.

33. Elusad järglased tuleb üle lugeda ja määrata nende sugu, nt visuaalse vaatluse või anogenitaalse vahemaa määramisega (34, 35), ning iga poega pesakonnas tuleks kaaluda kohe pärast sündi või varsti selle järel, vähemalt kaks korda nädalas imetamise ajal ja vähemalt iga kahe nädala tagant pärast seda. Suguküpsuse saabumise määramiseks tuleks igas pesakonnas vähemalt ühel isasloomal ja ühel emasloomal määrata vanus ja kehamass, kui neil toimub tupe avanemine (36) või eesnaha eraldumine (37).

▼M5

Käitumise ontogenees

34. Valitud käitumisviisinäitajate arengut tuleks mõõta sobivas vanuses vähemalt ühel pojal kummastki soost igas pesakonnas, kusjuures kõigil katsepäevadel kasutatakse kõikide käitumisviisinäitajate määramiseks samu loomi. Mõõtmispäevad jaotatakse ühtlaselt üle vaatluste aja, et määrata normaalsete käitumisjoonte areng või nende muutused, mis on seotud dooside manustamisega (38). Hinnata võiks näiteks järgmiste käitumisjoonte kujunemist: õige kehaasendi taastamise refleks, negatiivne geotaksis ja motoorne aktiivsus (38, 39, 40).

Motoorne aktiivsus

35. Motoorset aktiivsust tuleks jälgida (41, 42, 43, 44, 45) võõrutuseelses vanuses ja täiskasvanuvanuses. Katsete kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Katsete periood peab olema piisavalt pikk, et näidata kemikaaliga töötlemata kontrollrühmas katsete perioodi jooksul tekkivat harjumist. Käitumise ontogeneesi hindamiseks on väga soovitatav kasutada motoorse aktiivsuse hindamist. Kui seda kasutatakse käitumise ontogeneesi hindamiseks, tuleks kõikides võõrutuseelsetes katsetes kasutada samu loomi. Katseid tuleks teha piisava sagedusega, et demonstreerida katsete perioodi jooksul tekkivat harjumist (44). Selleks võib kuluda kolm sessiooni enne võõrutamist ja võõrutamise päeval (nt päevad PND 13, 17, 21). Samu ühe pesakonna loomi tuleks vaadelda ka täiskasvanueas enne katse lõpetamist (nt päevad PND 60–70). Katseid võib vajaduse korral teha ka lisapäevadel. Motoorset aktiivsust tuleks mõõta salvestusseadmega automatiseeritud aparaadi abil, millega saab määrata nii tegevuse hoogustumist kui ka vähenemist (nt baastegevus, mida seadmega saab mõõta, ei tohiks olla nii vähene, et selle vähenemist ei õnnestu registreerida, ega nii hoogne, et selle edasist hoogustumist ei saa registreerida). Iga seadet tuleb kontrollida standardmeetodiga, et tagada võimalikkuse piires eri seadmete mõõtmiste ja eri päevadel toimuvate mõõtmiste usaldusväärsus. Doosirühmade loomad jaotatakse eri seadmete vahel võimalikult tasakaalustatult. Iga loomaga tuleks katseid teha eraldi. Doosirühmade katsed peavad toimuma tasakaalustatult eri aegadel, et tulemusi ei mõjutaks tegevuse ööpäevased rütmid. Tuleks püüda tagada, et katsetingimuste varieeruvus oleks võimalikult väike ja et ei esineks süstemaatilist viga. Paljude käitumisnäitajate mõõtmist mõjutavad sellised muutujad nagu müratase, katsepuuri kuju ja suurus, temperatuur, suhteline õhuniiskus, valgustustingimused, lõhnad, kodupuuri või uue katsepuuri kasutamine ja tähelepanu häirivad keskkonnatingimused.

Motoorne ja sensoorne funktsioon

36. Motoorset ja sensoorset funktsiooni tuleks üksikasjalikult uurida vähemalt üks kord noorukieas ja üks kord noore täiskasvanu eas (nt PND 60–70). Katsete tegemise kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Tuleb teha piisavalt katseid, et koguda vajalikud kvantitatiivsed andmed sensoorsete funktsioonide kohta (nt somatosensoorsed ja vestibulaarfunktsioonid) ja motoorsete funktsioonide kohta (nt jõud, koordinatsioon). Mõned motoorsete ja sensoorsete funktsioonide näited on tõukerefleks (tallarefleks) (46), õige kehaasendi taastamise refleks (47, 48), ehmatava helisignaaliga harjumine (40, 49, 50, 51, 52, 53, 54) ja esilekutsutud võimed (55).

▼M5

Õppimise ja mälu katsed

37. Assotsiatiivse õppimise ja mälu katse tuleks teha pärast võõrutamist (nt päeval 25 ± 2) ja noorte täiskasvanutega (PND 60 ja vanemad). Katsete kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Nende kahe arengutaseme puhul võib kasutada sama või eraldi katset. Võõrutatud poegade ja täiskasvanud rottide õppimise ja mälu katse(te) valimisel lubatakse teatavat paindlikkust. Katse(d) tuleks siiski kavandada selliselt, et oleksid täidetud kaks kriteeriumi. Esiteks, õppimist tuleks hinnata mitme korduva õppimiskatse või -sessiooni jooksul ilmnevate muutuste kaudu või ühtainukest ülesannet hõlmava katsega ja võrrelda seda kontrollkatsega, milles kontrollitakse õpetamiskatse võimalikke mitteassotsiatiivseid mõjusid. Teiseks peaksid katsed hõlmama mingil määral (lühiajalise või pikaajalise) mälu kasutamist, lisaks algsele äraõppimisele (omandamine), kuid seda mälu näitajat ei saa registreerida, kui sama katsega ei ole mõõdetud omandamise näitajat. Kui õppimise ja mälu katsetest ilmneb kemikaali mõju, tuleb kaaluda lisakatsete korraldamist, et jätta kõrvale alternatiivsed tõlgendused, mille aluseks on sensoorsed või motivatsioonilised muutused ja/või motoorse suutlikkuse muutumine. Lisaks eespool nimetatud kahele kriteeriumile on soovitatav, et õppimise ja mälu katse tuleks valida nii, et katse oleks tõendatult tundlik uuritava kemikaali suhtes, kui kirjandusest on kättesaadav kõnealune teave. Kui sellist teavet ei ole, võiksid selliste katsete näideteks, mida võib teha eespool kirjeldatud kriteeriumide täitmiseks, olla passiivne vältimine (43, 56, 57), viivitusega reageerimine asendile täiskasvanud roti (58) või rotipoja (59) puhul, haistmise kaudu mõjutamine (43, 60), Morrise veelabürindi katse (61, 62, 63), Bieli või Cincinnati labürindi katse (64, 65), radiaallabürindi katse (66), T-labürindi katse (43) ning ajakavast sõltuva käitumise omandamine ja säilitamine (26, 67, 68). Kirjanduses on kirjeldatud veel muid katseid võõrutatud rotipoegade (26, 27) ja täiskasvanud rottide jaoks (19, 20).

Surmamisjärgne uurimine

38. Emaloomad võib pärast järglaste võõrutamist surmata.

39. Järglaste neuropatoloogiliseks uurimiseks kasutatakse kudesid, mis on saadud loomadelt, kes on humaanselt surmatud päeval PND 22 või varem (PND 11 — PND 22) või katse lõpetamisel. Päeval PND 22 surmatud järglaste puhul tuleks hinnata ajukudesid; katse lõpetamisel surmatud loomade puhul tuleks hinnata nii kesknärvisüsteemi kudesid kui ka perifeerse närvisüsteemi kudesid. Päeval PND 22 või varem surmatud loomad võib fikseerida immersiooni või perfusiooniga. Katse lõpetamisel surmatud loomad tuleks fikseerida perfusiooniga. Koenäidiste ettevalmistamisel tuleks kõikidel etappidel — loomade perfusioon, kudede väljalõikamine, kudede töötlemine ja mikroskoobipreparaatide värvimine — kasutada tasakaalustatud katsekorraldust, nii et igas partiis oleks iga doosirühma esindav valim. Täiendavad suunised neuropatoloogia kohta on esitatud OECD juhenddokumendis nr 20 (9), vt ka (103).

Koeproovide töötlemine

40. Kõik lahkamise ajal märgatavad suured kõrvalekalded tuleks üles märkida. Võetud koeproovid peaksid esindama kõiki peamisi närvisüsteemi piirkondi. Koeproove tuleks säilitada sobivas fiksaatoris ja neid tuleks töödelda vastavalt avaldatud standardsetele histoloogiajuhenditele (69, 70, 71, 103). Parafiinis konserveerimine on sobiv kesk- ja perifeerse närvisüsteemi

▼M5

kudede puhul, kuid osmiumi kasutamine järelfikseerimiseks koos epoksükonserveerimisega võib olla sobiv, kui on vaja saavutada parem lahutusvõime (nt perifeersete närvide puhul, kui kahtlustatakse perifeerset neuropaatiat ja/või perifeersete närvide morfomeetriliseks analüüsiks). Morfomeetriliseks analüüsiks kogutav ajukude tuleks kõikide doosirühmade puhul paigutada sobivasse säilituskeskkonda samal ajal, et vältida kokkutõmbumisest tingitud artefakte, mis võivad kaasneda pikaajalise säilitamisega fiksaatoris (6).

Neuropatoloogiline uuring

41. Kvalitatiivse uuringu eesmärgid on järgmised:

i) teha kindlaks närvisüsteemi piirkonnad, milles esineb nähtavaid neuropatoloogilisi muutusi;

ii) teha kindlaks, millist tüüpi neuropatoloogilised muutused tulenevad kokkupuutest uuritava kemikaaliga, ning

iii) määrata neuropatoloogiliste muutuste ulatus raskusastme järgi.

Koeproovidest saadud representatiivseid histoloogilisi lõikeid peaks mikroskoobiga uurima nõuetekohaselt koolitatud patoloog, et leida tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta. Igale neuropatoloogilisele muutusele tuleks subjektiivse hindamisskaala alusel omistada raskusaste. Värvimine hematoksüliini ja eosiiniga võib olla piisav, et hinnata päeval PND 22 või varem humaanselt surmatud loomade aju lõikeid. Katse lõpetamisel surmatud loomade kesknärvisüsteemi ja perifeerse närvisüsteemi lõigete uurimiseks soovitatakse kasutada aga müeliinivärve (nt *Luxol fast blue*/kresüülviolett) ja hõbedapõhiseid värve (nt Bielschowsky või Bodiani värv). Vastavalt patoloogi eksperthinnangule ja võttes arvesse täheldatud muutusi, võib kasutada muid sobivaid värve, et teha kindlaks ja iseloomustada teatavat tüüpi muutusi (nt gliiafibrillide happelise proteiini (GFAP) või lektiini histokeemia, et hinnata gliia ja mikrogliia muutusi (72), fluorojadeiit-värv nekroosi tuvastamiseks (73, 74) või närvide degeneratsiooni suhtes spetsiifiline hõbedapõhine värv (75)).

42. Tuleks teha morfomeetriline (kvantitatiivne) hindamine, kuna need andmed võivad aidata tuvastada kokkupuutega seotud mõju ja on väärtuslikud kemikaaliga kokkupuutest tingitud ajumassi või aju morfoloogia erinevuste tõlgendamisel (76, 77). Närvikoest tuleks võtta proovid ja valmistada need ette morfomeetriliseks hindamiseks. Morfomeetriline hindamine võib hõlmata näiteks aju teatavate piirkondade joonmõõtmete või pindala määramist (78). Joonmõõtmete või pindala määramiseks on vaja kasutada homoloogseid lõikeid, mis on hoolikalt valitud usaldusväärsete mikroskoopiliste punktide järgi (6). Et tuvastada kemikaaliga kokkupuute mõju sellistele näitajatele nagu teatava neuroanatoomilise piirkonna maht või rakkude arv, võib kasutada stereoloogiat (79, 80, 81, 82, 83, 84).

43. Ajus tuleks otsida tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta, mis on seotud dooside manustamisega, ja piisavad näidised tuleks võtta kõikidest peamistest aju piirkondadest (nt haistmissibulad, ajukoor, hipokamp, basaalganglionid, talamus, hüpotalamus, keskaju (*tectum*, *tegmentum* ja ajuvarred), ajusild, piklikaju, väikeaju), et läbivaatamine oleks põhjalik. On oluline, et kõigilt loomadelt võetaks lõiked samas tasapinnas. Katse lõpetamisel humaanselt surmatud täiskasvanud loomadelt tuleks võtta seljaaju ja perifeerse närvisüsteemi representatiivsed lõiked. Uuritavad alad peaksid hõlmama silma koos nägemisnärvi ja võrkkestaga, seljaaju kaela- ja nimmetüve kohal, selgmisi ja kõhtmisi närvijuuri, proksimaalset istmikunärvi, proksimaalset säärenärvi (põlve juures) ja säärenärvi sääremarjalihase harusid. Seljaajust ja perifeersest närvist tuleks teha nii ristkui ka pikilõiked.

▼M5

44. Neuropatoloogilisel hindamisel tuleks otsida närvisüsteemi arenguhäirete tunnuseid (6, 85, 86, 87, 88, 89), lisaks rakulistele muutustele (nt närvirakkude vakuolisatsioon, degeneratsioon, nekroos) ja koemuutustele (nt glioos, leukotsüütide infiltratsioon, tsüstide moodustumine). Sellega seoses on oluline, et dooside manustamisega seotud muutusi tuleb eristada tavalistest arenguga seotud muutustest, mis peaksid toimuma looma surmamise ajaks (90). Arengu häirumisele viitavad muu hulgas näiteks järgmised leiud:

— haistmissibulate, aju või väikeaju üldsuuruse või kuju muutused;

— aju eri piirkondade suhtelise suuruse muutused, sealhulgas sellised aju piirkondade suuruse muutused, mis on tingitud tavaliselt ajutiste rakupopulatsioonide või aksonite väljakasvude kaotsiminekust või püsimajäämisest (nt väikeaju väline germinaalkiht, mõhnkeha);

— muutused rakkude paljunemises, migreerumises ja diferentseerimises, millele osutab ülemäärane apoptoos või nekroos, väärasetsusega, valesuunaliste või vääralt moodustunud närvirakkude kogumid või hajutatud populatsioonid või muutused ajukoorestruktuuride kihtide suhtelises suuruses;

— muutused müeliniseerumises, sealhulgas müeliiniga kaetud struktuuride muutunud üldsuurus või värvumine;

— vesipea tunnused, eelkõige vatsakeste suurenemine, ajuveejuha ahenemine ja ajupoolkerade õhenemine.

Neuropatoloogiliste muutuste doosi ja toime vahelise sõltuvuse analüüsimine

45. Kvalitatiivse ja kvantitatiivse neuropatoloogilise analüüsi puhul soovitatakse toimida järgmiselt. Esiteks võrreldakse suure doosi rühma loomade lõikeid kontrollrühma loomade lõigetega. Kui suure doosi rühma loomadel neuropatoloogilisi muutusi ei leita, ei ole täiendav analüüs vajalik. Kui suure doosi rühmade loomadel leitakse neuropatoloogilisi muutusi, uuritakse keskmise ja madala doosi rühmade loomi. Kui katse suure doosi rühmaga lõpetatakse loomade surma või muu segava mürgistuse tõttu, tuleks suure ja keskmise doosi rühma loomadel uurida neuropatoloogilisi muutusi. Kui väiksema doosi rühma loomadel esineb tunnuseid, mis viitavad kemikaali neurotoksilisusele, tuleks neuropatoloogiline analüüs teha osutatud rühmade loomadega. Kui kvalitatiivse või kvantitatiivse vaatlusega leitakse dooside manustamisega seotud neuropatoloogilisi muutusi, tuleks määrata kõikide kahjustuste või morfomeetriliste muutuste esinemise, sageduse ja raskusastme sõltuvus doosist, kasutades kõikide doosirühmade loomade vaatluse andmeid. Hindamine peaks hõlmama kõiki ajupiirkondi, milles on leitud neuropatoloogilisi muutusi. Iga kahjustuste tüübi puhul tuleks kirjeldada näitajaid, mille alusel määrati raskusaste, sealhulgas omadused, mida kasutati raskusastmete eristamiseks. Iga tüüpi kahjustuste ja nende raskusastmete esinemissagedus tuleks registreerida ja teha statistiline analüüs, et hinnata doosi ja toime vahelise sõltuvuse laadi. Soovitatakse kasutada koodmärgisega varustatud mikroskoobipreparaate (91).

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

46. Andmed tuleks esitada iga looma kohta ja samuti kokkuvõtliku tabelina, milles iga katserühma kohta näidatakse muutuste tüübid ning iga tüübi puhul emasloomade, järglaste (eraldi kummastki soost) ja pesakondade arv, kellel see esines. Kui järglased viiakse pärast sündi otse kokkupuutesse kemikaaliga, tuleb teatada kokkupuuteviis, kestus ja kokkupuute ajavahemik.

▼M5

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

47. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuring annab teavet selle kohta, millist mõju avaldab korduv sünnieelne ja varane sünnijärgne kokkupuude kemikaaliga. Kuna rõhk on pandud nii üldise mürgisuse kui ka arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse näitajate määramisele, võimaldavad katsetulemused teha vahet järglaste arengu häireid põhjustaval neurotoksilisusel, kui üldist mürgistust emaloomal veel ei täheldata, ja sellisel arenguhäireid põhjustaval neurotoksilisusel, mis avaldub ainult kontsentratsioonil, mis on mürgine ka emaloomale. Kuna seosed katse kavandamise, andmete statistilise analüüsi ja bioloogilise olulisuse vahel on keerulised, kasutatakse arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu andmete õigeks tõlgendamiseks eksperdihinnanguid (107, 109). Katsetulemuste tõlgendamisel kasutatakse tõendite kaalukusel põhinevat lähenemisviisi (20, 92, 93, 94). Arutada tuleks käitumuslike ja morfoloogiliste leidude tüüpe ning doosi ja toime vahelist sõltuvust. Sellise iseloomustuse koostamisel tuleks kasutada kõiki andmeid arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse kohta, sealhulgas inimeste epidemioloogilisi uuringuid või juhtumiaruandeid ja katseloomade uuringuid (nt toksiko-kineetilised andmed, struktuuri-aktiivsuse sõltuvused, muude toksikoloogiauuringute andmed). See hõlmab seost uuritava kemikaali doosi ja neurotoksilise mõju olemasolu või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel kummagi soo puhul (20, 95).

48. Andmete hindamisel tuleks arutada nii bioloogilist kui ka statistilist tähtsust. Statistilist analüüsi tuleks vaadelda kui vahendit, mis suunab andmete tõlgendamist, kuid ei määra seda. Statistilise olulisuse puudumine ei tohiks olla ainus põhjendus järeldamiseks, et kokkupuude kemikaaliga ei avalda mõju, ja statistiline olulisus ei saa olla ainus põhjendus, millest järeldatakse, et kemikaal avaldab mõju. Et hoiduda võimaliku valenegatiivse järelduse tegemisest ja kuna „mõju puudumise” tõendamine on juba põhimõtteliselt raske, tuleks arutada kõiki olemasolevaid andmeid mõju olemasolu kohta ja varasema kontrolli andmeid, eriti kui katse näitas, et dooside manustamine mõju ei avalda (102, 106). Valepositiivse järelduse tõenäosust tuleks arutada kõikide andmete statistilise hindamise põhjal (96). Hindamisel tuleks vaadelda neuropatoloogiliste ja käitumuslike muutuste vahelist seost, kui täheldati mingeid muutusi.

49. Kõigi andmete analüüsimisel tuleb kasutada statistilisi mudeleid, milles arvestatakse katse korraldust (108). Parameetrilise või mitteparameetrilise analüüsi valimine peaks olema põhjendatud, võttes arvesse selliseid tegureid nagu andmete laad (otsesed või teisendatud andmed) ja nende jaotust, samuti valitud statistilise analüüsi meetodi suhtelist stabiilsust. Lähtudes uuringu eesmärgist ja katse kavast, tuleks statistilise analüüsi meetod valida nii, et viia miinimumini I tüüpi (valepositiivse) vea ja II tüüpi (valenegatiivse) vea võimalikkus (96, 97, 104, 105). Kui arengu-uuringus kasutatakse loomaliiki, kelle pesakonnas on mitu poega, kellega tehakse katseid, tuleks statistilises mudelis vaadelda pesakonda, et vältida I tüüpi vea võimaluse olulist suurenemist (98, 99, 100, 101). Statistiline mõõtmisühik peaks sel juhul olema pesakond ja mitte poeg. Katsed peaksid olema kavandatud nii, et ühe pesakonna liikmeid ei käsitataks sõltumatute vaatlusaluste loomadena. Kui ühe ja sama vaatlusobjekti põhjal määratakse mitut näitajat, tuleks nende näitajate analüüsiks kasutada statistilisi mudeleid, milles võetakse arvesse, et mõõtmised ei ole sõltumatud.

Katseprotokoll

50. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— füüsiline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— identifitseerimisandmed, sh päritolu;

▼**M5**

— preparaadi puhtus ja teadaolevad või eeldatavad lisandid.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valiku põhjendamine, kui kandeaineks ei ole vesi või füsioloogiline soolalahus.

Katseloomad:

— kasutatud loomaliik ja liin, ning põhjendus, kui see on muu kui rott;

— katseloomade tarnija;

— loomade arv, vanus katse alguses ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, sööt, vesi jne;

— iga looma mass katse alguses.

Katsetingimused:

— doositaseme valimise põhjendus;

— dooside manustamise tee ja ajavahemiku põhjendus;

— manustatavate dooside üksikasjad, sh kandeaine, mahu ja manustatava aine füüsilise vormi üksikasjad;

— üksikasjad uuritava kemikaali koostise/söödavalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

— meetod, mida kasutati emaloomade ja järglaste kordumatuks märgistamiseks;

— üksikasjalik randomiseerimismeetodi(te) kirjeldus: kuidas juhuslikkuse alusel jaotati emaloomad doosirühmadesse, valiti välja järglased surmamiseks ja määrati järglased katserühmadesse;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— vajaduse korral söödas/joogivees või sissehingatavas õhus oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendus tegelikuks päevadoosiks (mg kehamassi kg kohta);

— keskkonnatingimused;

— üksikasjad sööda ja vee kvaliteedi kohta (nt kraanivesi, destilleeritud vesi);

— uuringu alustamise ja lõpetamise kuupäevad.

Vaatlused ja katsemeetodid:

— üksikasjalik meetodi kirjeldus: kuidas standarditi leiud jm protseduurid, samuti märgatud leidudele hindepunktide andmise tööjuhendid;

— kõikide katses kasutatud meetodite loetelu ja nende kasutamise põhjendused;

— kõikide kasutatud käitumuslike, funktsionaalsete, patoloogia-, neurokeemia või elektrofüsioloogiameetodite üksikasjad, sealhulgas teave automaatseadmete kohta;

— seadmete kaliibrimise meetodid, seadmete samaväärsuse tagamine ja doosirühmade tasakaalustatud jaotamine katsete tegemisel;

— lühike selgitus kõigi otsuste kohta, milles kasutati eksperdihinnanguid.

▼**M5**

Tulemused (individuaalsed tulemused ja nende kokkuvõte, sealhulgas võimaluse korral keskväärtus ja dispersioon):

— loomade arv uuringu alguses ja uuringu lõpus;

— iga katsemeetodi puhul kasutatud loomade ja pesakondade arv;

— iga looma identifitseerimisnumber ja pesakond, millest loom on pärit;

— pesakonna suurus ja sünnijärgne keskmine mass sugude kaupa;

— kehamassi ja selle muutuse andmed, sealhulgas emaloomade ja järglaste lõplik kehamass;

— sööda tarbimise ja vajaduse korral vee tarbimise andmed (nt kui uuritavat ainet manustatakse vee kaudu);

— toksilist reaktsiooni käsitlevad andmed sugude ja doosimäärade kaupa, sh surma aeg ja põhjus, kui see on asjakohane;

— toksilisuse laad, raskusaste, kestus, avaldumise päev, kellaaeg, ja edasiste üksikasjalike kliiniliste vaatluste käik;

— arengu iga olulise näitaja (kehamass, suguküpsuse saabumine ja käitumise ontogenees) hindepunktide arv igal vaatlusel;

— kõikide käitumisega seotud, funktsionaalsete, neuropatoloogiliste, neurokeemiliste, elektrofüsioloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus sugude kaupa, sealhulgas nii suurenemised kui ka vähenemised, võrreldes kontrollrühmadega;

— lahkamise tulemused;

— aju mass;

— neuroloogiliste tunnuste põhjal pandud diagnoosid ja oletatud kahjustused, sealhulgas looduslikult esinevad haigused või haigusseisundid;

— tüüpiliste muutuste fotod;

— madala lahutusvõimega kujutised, et oleks võimalik hinnata morfomeetriaks kasutatud lõigete homoloogsust;

— andmed absorptsiooni ja metabolismi kohta, sh täiendavad andmed eraldi toksiko-kineetilisest uuringust, kui need on olemas;

— tulemuste statistiline analüüs koos andmete analüüsiks kasutatud statistiliste mudelitega ja tulemused, sõltumata sellest, kas need olid olulised või mitte;

— uuringust osavõtnute loetelu koos väljaõppe näitamisega.

Tulemuste arutelu:

— teave doosi ja selle mõju kohta, sugude ja rühmade kaupa;

— muude toksiliste mõjude (sugude ja rühmade kaupa) seos uuritud kemikaali võimaliku neurotoksilisuse kohta tehtud järeldusega;

— toksiko-kineetilise teabe mõju järeldustele;

— mõju võrdlus muude tuntud neurotoksiliste ainete mõjuga ja mõju sarnasus;

▼M5

— andmed, mis kinnitavad katsemeetodi usaldusväärsust ja tundlikkust (st positiivsed ja varasemad kontrolli andmed);

— seosed neuropatoloogilise ja funktsionaalse mõju vahel, kui on seoseid;

— NOAEL või võrdlusdoos emaloomade ja järglaste puhul, sugude ja rühmade kaupa.

Järeldused:

— tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav neurotoksiline aine, ja täheldatav kahjuliku toimeta doos.

KIRJANDUS

1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13–14 June 1995.

2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98–239. Vt: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Vt: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79–91.

5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101–111.

6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93–100.

7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.

8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Vt: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage) = en].

9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Vt: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173–292.

11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼**M5**

12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188–197.

13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14) Käesoleva lisa peatükk B.34. Ühe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring.

15) Käesoleva lisa peatükk B.35. Kahe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring.

16) Käesoleva lisa peatükk B.43. Neurotoksilisuse uuring närilistel.

17) Käesoleva lisa peatükk B.31. Sünnieelse arengu mürgisuse uurimus.

18) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Vt: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Vt: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499–509.

23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Toxic. Appl. Toxicol., 38:2–6.

24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110–112.

25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Toxic. Appl. Toxicol., 13:118–136.

26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.

28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87–94.

30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. Sci., 49: 1–4.

31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433–439.

▼**M5**

33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449–457.

34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383–390.

35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350–365.

36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579–586.

37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298–303.

38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489–95.

39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896–920.

40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. Vt: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67–100.

41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53–66.

42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37–82.

43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117–129.

44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247–260.

45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599–609.

46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405–411.

47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661–669.

48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589–591.

49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. Vt: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287–351

50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107–128.

51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181–211.

▼**M5**

52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199–211.

53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25–30.

54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. Vt: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125–145.

56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321–332.

57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247–296.

58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237–244.

59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98–105.

60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465–479.

61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47–60.

62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29–69.

63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60–90.

64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235–241.

65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387–399.

66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327–332.

67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342–352.

68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122–131.

70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84–107.

71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼M5

72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291–304.

73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123–130.

74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365–372.

75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545–561.

76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745–755.

77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417–432.

78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305–310.

81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262–268.

82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707–710.

83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51–61.

84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113–121.

86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294–298.

87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. Vt: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3–41.

88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70–74.

▼M5

89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127–133.

92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401–405.

93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.

94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113–126.

97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21–27.

98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329–335.

99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165–172.

100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221–228.

101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587–90.

102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345–352.

103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296–313.

104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205–210.

105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295–301.

106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266–287.

107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288–325.

▼**M5**

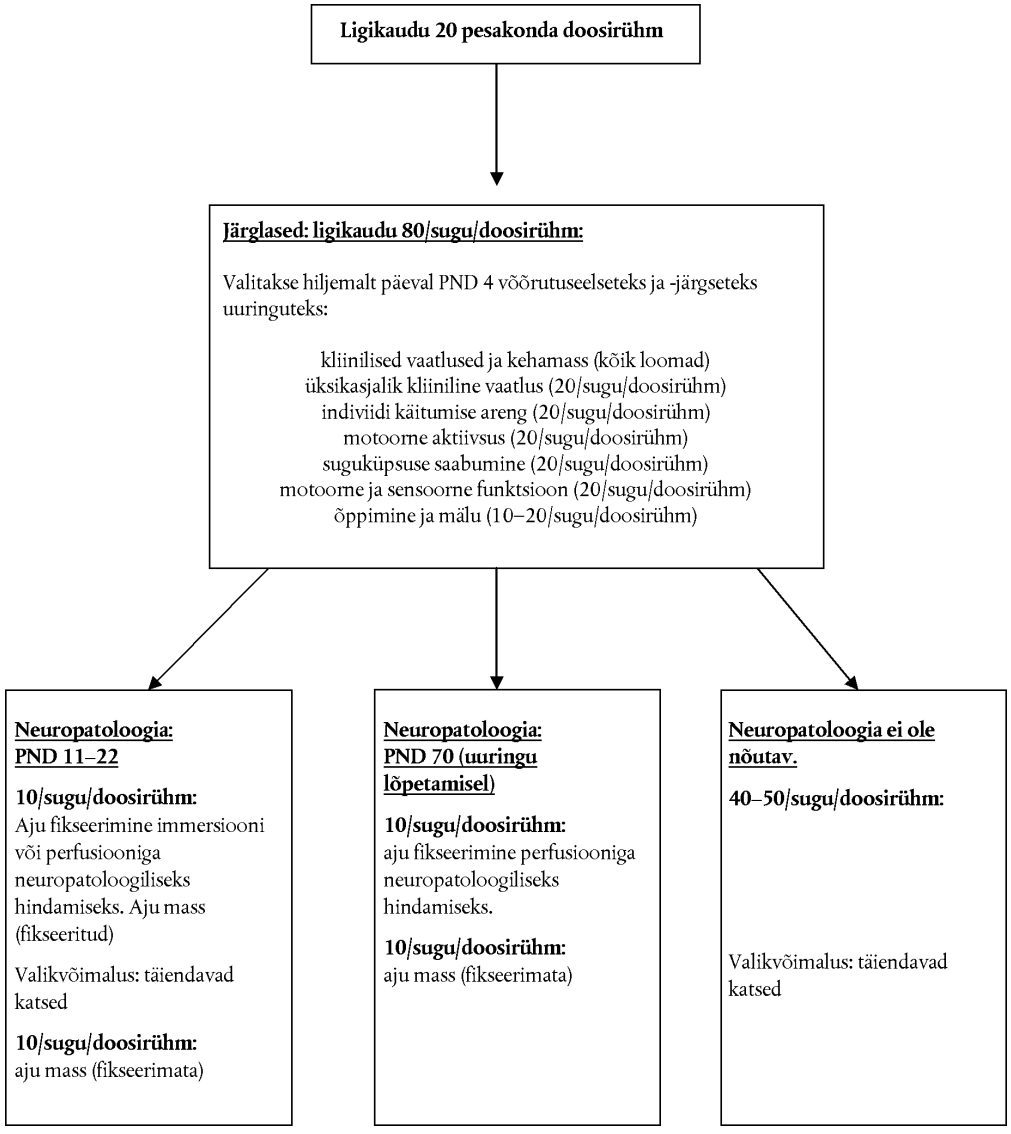
108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326–348.

109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349–381.

▼**M5**

Joonis 1

Üldine katseskeem funktsionaalsete ja käitumuslike katsete tegemiseks, neuropatoloogia hindamiseks ja ajumassi määramiseks. Diagramm põhineb punktides 13–15 esitatud kirjeldusel (PND — päev pärast sündi). Katsete jaoks loomade määramise näited on esitatud 1. liites



▼**M5**

1. liide

1. Allpool esitatud tabelis on kirjeldatud näiteid, kuidas võib määrata loomi katsete tegemiseks. Näidete eesmärk on selgitada, et katseloomi võib katseteks määrata mitmel viisil, olenevalt katse korralduse põhimõttest.

1. näide

2. Võõrutuseelseteks käitumise ontogeneesi katseteks kasutatakse üks komplekt poegi, mille koosseis on 20 looma kummagi soo ja iga doosimäära kohta (edaspidi „looma/sugu/doosimäär”) (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 22. Aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogilise hindamise jaoks. Lisaks kogutakse ajumassi andmed, kasutades ülejäänud 10 isas- ja 10 emaslooma fikseerimata aju.

3. Võõrutusjärgsete funktsionaalsete ja käitumuslike katsete (üksikasjalikud kliinilised vaatlused, motoorne aktiivsus, helisignaaliga harjumise ja kognitiivse funktsiooni katsed noorukieas) ning suguküpsuse saabumise vanuse hindamiseks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.

4. Kognitiivsete funktsioonide testimiseks noorte täiskasvanute puhul (st PND 60–70) kasutatakse ära kolmas komplekt, mille koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) surmatakse uuringu lõpus, aju eemaldatakse ja kaalutakse.

5. Ülejäänud 20 looma/sugu/doosimäär hoitakse varuks võimalike lisakatsete jaoks.

Tabel 1

Poeg nr [a]		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
1	5	20 M + 20 N	Käitumise ontogenees
		10 M + 10 N	PND 22 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
		10 M + 10 N	PND 22 aju mass
2	6	20 M + 20 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused
		20 M + 20 N	Motoorne aktiivsus
		20 M + 20 N	Suguküpsuse saabumine
		20 M + 20 N	Motoorne ja sensoorne funktsioon
		20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (PND 25)
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70

▼**M5**

Poeg nr ([a])		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
3	7	20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu)
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass ~ PND 70
4	8	—	Reservloomad asendamiseks või lisakatseteks

([a]) Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

2. näide

6. Võõrutuseelseteks käitumise ontogeneesi katseteks kasutatakse üks komplekt poegi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 11. Aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogilise hindamise jaoks.

7. Teine komplekt loomi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja1 emasloom igast pesakonnast) kasutatakse võõrutusjärgseteks vaatlusteks (üksikasjalikud kliinilised vaatlused, motoorne aktiivsus, suguküpsuse saabumise vanuse ning motoorse ja sensoorse funktsiooni hindamine). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.

8. Noorukite ja noorte täiskasvanute kognitiivsete funktsioonide katsetamiseks kasutatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Kognitiivsete funktsioonide katseteks päeval PND 23 ja noore täiskasvanu vanuses kasutatakse erinevaid loomi. Uuringu lõpetamisel surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär, kellega olid tehtud täiskasvanuea katseid, aju eemaldatakse ja kaalutakse.

9. Ülejäänud 20 looma/sugu/doosimäär, keda ei valitud välja katseteks, surmatakse ja kõrvaldatakse võõrutamisel.

Tabel 2

Poeg nr ([a])		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
1	5	20 M + 20 N	Käitumise ontogenees
		10 M + 10 N	PND 11 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
2	6	20 M + 20 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused
		20 M + 20 N	Motoorne aktiivsus
		20 M + 20 N	Suguküpsuse saabumine
		20 M + 20 N	Motoorne ja sensoorne funktsioon
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass/ neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70

▼**M5**

Poeg nr [a]		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
3	7	10 M + 10 N [b]	Õppimine ja mälu (PND 23)
3	7	10 M + 10 N [b]	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu) Noore täiskasvanu aju mass
4	8	–	Päeval PND 21 surmatud ja kõrvaldatud loomad.

[a] Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

[b] Kognitiivseteks katseteks päeval PND 23 ja noore täiskasvanu eas kasutatakse erinevaid järglasi (nt paarisarvulised ja paarituarvulised pesakonnad kokku 20 pesakonnast).

3. näide

10. Päeval PND 11 kasutatakse aju massi ja neuropatoloogia hindamiseks üks komplekt poegi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 11, nende aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogiliseks hindamiseks. Lisaks kogutakse ajumassi andmed, kasutades ülejäänud 10 isas- ja 10 emaslooma iga doosimäära kohta.

11. Käitumise ontogeneesi (motoorne aktiivsus) vaatlusteks ja võõrutusjärgseteks vaatlusteks (motoorne aktiivsus ja suguküpsuse saabumise vanuse hindamine) ning noorukite kognitiivsete funktsioonide katseteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast).

12. Motoorse ja sensoorse funktsiooni katseteks (helisignaaliga harjumine) ja üksikasjalikeks kliinilisteks vaatlusteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.

13. Noore täiskasvanukognitiivsete funktsioonide katseteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) surmatakse uuringu lõpus, aju eemaldatakse ja kaalutakse.

Tabel 3

Poeg nr [a]		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
1	5	10 M + 10 N	PND 11 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
		10 M + 10 N	PND 11 aju mass
2	6	20 M + 20 N	Käitumise ontogenees (motoorne aktiivsus)
		20 M + 20 N	Motoorne aktiivsus
		20 M + 20 N	Suguküpsuse saabumine
		20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (PND 27)

▼**M5**

Poeg nr [a]		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
3	7	20 M + 20 N	Helisignaal (noorukid ja noored täiskasvanud)
		20 M + 20 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass/ neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70
4	8	20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu)
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass

[a] Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

▼**M5**

2. liide

Mõisted

Kemikaal – aine või segu

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M5

B.54. UTEROTROOFNE BIOKATSE NÄRILISTEL: KIIRE SÕELKATSE ÖSTROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 440 (2007). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (1). Üks tegevussuund oli töötada välja näriliste uterotroofse biokatse juhend. Näriliste uterotroofne biokatse läbis seejärel ulatusliku valideerimisprogrammi; sealhulgas koostati üksikasjalik taustadokument (2, 3) ning tehti ulatuslikud laborisisesed ja laboritevahelised uuringud, et näidata biokatse asjakohasust ja reprodutseeritavust tugeva võrdlusöstrogeeni, nõrkade östrogeeniretseptori agonistide, tugeva östrogeeniretseptori antagonisti ja mõju mitteomava võrdluskemikaali puhul (4, 5, 6, 7, 8, 9). Käesoleva katsemeetodi B.54 aluseks on kogemused, mis saadi valideerimiskatsete programmiga, ja programmi käigus östrogeeniagonistidega saadud tulemused.

2. Uterotroofne biokatse on kiire sõelkatse, mis töötati välja 1930. aastatel (27, 28) ja mida esmakordselt standarditi sõelkatsena kasutamiseks 1962. aastal (32, 35). See põhineb emaka massi suurenemisel või nn uterotroofsel reaktsioonil (vt ülevaade 29). Sellega hinnatakse kemikaali võimet kutsuda esile bioloogilist mõju, mis sarnaneb looduslike östrogeenide (nt 17ß-östradiooli) agonistide või antagonistide mõjuga, kuid meetodit kasutatakse hoopis sagedamini agonistide kui antagonistide leidmiseks. Emakas reageerib östrogeenidele kahel viisil. Esmane reaktsioon on massi suurenemine, mida põhjustab vee imamine. Sellele järgneb massi suurenemine kudede kasvu tulemusel (30). Hiire- ja rotiemaka reageerimine on kvalitatiivselt võrreldav.

3. Biokatset saab kasutada *in vivo* sõeluuringuks ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” osana (2. liide). Selles kontseptuaalses raamistikus on uterotroofne biokatse 3. tasemel kui *in vivo* katse, mis annab andmeid üheainsa sisesekretsioonimehhanismi, nimelt östrogeensuse kohta.

4. Uterotroofne biokatse on kavandatud osana *in vitro* ja *in vivo* katsetest, millega tehakse kindlaks endokriinsüsteemi mõjutada võivaid kemikaale, et hinnata ohtusid inimese tervisele ja keskkonnale. OECD valideerimisprogrammis kasutati nii tugevaid kui ka nõrku östrogeeni antagoniste, et hinnata katse kasutamist östrogeensete kemikaalide väljaselgitamiseks (4, 5, 6, 7, 8). Sellega tõendati meetodi tundlikkust östrogeeniagonistide suhtes ja lisaks ka head laborisisest ja laboritevahelist korratavust.

5. Mis puutub mõjuta (n-ö negatiivsetesse) kemikaalidesse, siis valideerimisprogrammis kasutati vaid üht mõjuta võrdluskemikaali, mille kohta oli juba varem uterotroofse analüüsi ja ka *in vitro* retseptorisidumise ja retseptori katsetega tehtud kindlaks mõju puudumine, kuid on hinnatud veel OECD valideerimisprogrammist sõltumatuid täiendavaid andmeid, mis samuti toetavad uterotroofse biokatse selektiivsust östrogeeniagonistide kindlakstegemisel (16).

▼**M5**

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

6. Östrogeeni agonistid ja antagonistid toimivad östrogeeniretseptorite α ja β ligandidena ning võivad vastavalt aktiveerida või pidurdada retseptorite poolt kontrollitavat transkriptsiooni. See võib põhjustada tervisekahjustusi, sealhulgas reproduktiivfunktsiooni ja arengu häireid. Seepärast on vaja kiiresti hinnata kemikaale kui võimalikke östrogeeni agoniste või antagoniste. Kuigi ligandi afiinsus östrogeeniretseptori suhtes või reportergeeni transkriptsiooni aktiveerimine *in vitro* annab küll olulist teavet, on see siiski vaid üks ohtu põhjustavatest võimalikest teguritest. Muud tegurid võivad hõlmata metabolismi kaudu aktiveerimist või inaktiveerimist pärast kehasse sisenemist, jaotumist sihtkudedes ja väljutamist kehast, mis vähemalt osaliselt sõltub ka manustamisteest ja uuritavast kemikaalist. Seepärast on vaja kontrollida kemikaali võimalikku toimet *in vivo* asjakohastes tingimustes, kui kemikaali neeldumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamisega seotud omadused juba ise ei paku vajalikku teavet. Emaka koed reageerivad östrogeenidega stimuleerimisele kiire kasvuga, eriti laboris peetavate näriliste puhul, kus östraaltsükkel kestab umbes 4 päeva. Närilisi, eriti rotte, kasutatakse laialdaselt ka mürgisuse uuringutes ohu iseloomustamiseks. Seepärast on närilise emakas sobiv sihtorgan, millega saab teha *in vivo* sõeluuringuid östrogeeni agonistide ja antagonistide väljaselgitamiseks.

7. Käesolev katsemeetod põhineb OECD valideerimisuuringus kasutatud katse-eeskirjadel, mis osutusid usaldusväärseks ja korratavaks nii laborisisestes kui ka laboritevahelistes uuringutes (5, 7). Praegu on kättesaadavad kaks meetodit, nimelt eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emaslooma meetod (*OVX-adult method*) ja eemaldamata munasarjadega ebaküpse emase meetod (*immature method*). OECD valideerimiskatsete programmiga näidati, et nende meetodite tundlikkus ja reprodutseeritavus on võrreldavad. Meetod, milles kasutatakse ebaküpset emaslooma, kelle hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) telg on kahjustamata, on siiski mõnevõrra vähem spetsiifiline, kuid selle meetodiga saab uurida laiemat mõjude spektrit kui eemaldatud munasarjadega emaslooma meetodiga, kuna see näitab ka kemikaalide mõju HAS-teljele, mitte üksnes östrogeeniretseptorile. Roti HAS-telg hakkab toimima umbes 15. elupäevast. Enne nimetatud tähtaega ei saa gonadoliberiiniga (GnRH) puberteeti kiirendada. Kui emasloomad hakkavad jõudma puberteediikka, siis enne tupe avanemist on neil mitu n-ö vaikset tsüklit, millega ei kaasne tupe avanemist või ovulatsiooni, kuid kaasnevad teatavad hormoonitaseme kõikumised. Kui kemikaal otse või kaudselt stimuleerib HAS-telge, on tulemuseks enneaegne puberteet, varane ovulatsioon ja tupe varasem avanemine. Seda võivad põhjustada mitte ainult HAS-teljele toimivad kemikaalid, vaid ka mõned tavalisest suurema metaboliseeritava energia sisaldusega dieedid, mis stimuleerivad kasvu ja kiirendavad tupe avanemist, kuigi ei ole östrogeensed. Sellised kemikaalid ei tekita uterotroofset reaktsiooni täiskasvanud OVX-loomal, kuna tema HAS-telg ei tööta.

8. Loomade heaolu huvides tuleks eelistada ebaküpsete rottide meetodit, millega välditakse loomade kirurgilist eeltöötlemist ja ka selliste loomade võimalikku kasutamata jätmist, kellel esineb östruse alguse märke (vt punkt 30).

▼M5

9. Uterotroofne reaktsioon ei ole täielikult tingitud östrogeenidest, st seda võivad esile kutsuda ka kemikaalid, mis ei ole östrogeenide agonistid või antagonistid. Näiteks suhteliselt suured progesterooni, testosterooni või mitmesuguste sünteetiliste kollaskehahormoonide doosid võivad kõik põhjustada seda reaktsiooni (30). Igasugust reaktsiooni tuleb uurida histoloogiliselt tupe keratinisatsiooni ja sarvestumise suhtes (30). Olenemata reaktsiooni võimalikust põhjusest tuleks uterotroofse biokatse positiivse tulemuse puhul algatada täiendav uuring selguse saamiseks. Täiendavaid tõendeid östrogeensuse kohta võib saada *in vitro* katsetega, nagu östrogeeniretseptori sidumise katse ja transkriptsiooni aktivatsiooni katse või muud *in vivo* uuringud, näiteks emasloomade puberteedi katse.

10. Kui võtta arvesse, et uterotroofne biokatse on ette nähtud *in vivo* sõeluuringuks, on kontrollimisviisi valikul lähtutud nii loomade heaoluga seotud kaalutlustest kui ka korrastatud astmelise katsetamise strateegiast. Sel eesmärgil püüti hoolikalt kontrollida, kuivõrd korratavalt ja tundlikult lubab meetod kindlaks teha östrogeensust, mis on paljude kemikaalide puhul peamine mure; vähem pöörati tähelepanu katsega antiöstrogeensuse tõendamise küljele. Katsetati ainult ühte tugevat antiöstrogeeni, kuna selgelt teadaolevate antiöstrogeensete kemikaalide (millel ei ole mingit varjavat östrogeenset mõju) on väga piiratud. Käesolevas katsemeetodis käsitletakse seega östrogeensete omaduste tuvastamist; antagonistliku toime tuvastamist on käsitletud ühes juhenddokumendis (37). Biokatse korratavus ja tundlikkus puhtalt antiöstrogeense toimega kemikaalide puhul määratletakse täpsemalt hiljem, kui katset on tavameetodina mõnda aega kasutatud ja leitud rohkem sellise toimeviisiga kemikaale.

11. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomakaitse kohalikele normidele; järgmised loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele, ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (38), on nende suhtes ülimuslikud. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (25).

12. Nagu elusloomadega tehtavate katsete puhul tavaliselt, on enne katse algust oluline tagada, et andmed on tõepoolest vajalikud. Andmed võivad olla tõeliselt vajalikud näiteks järgmiste kahe olukorra puhul:

— suur oht kokkupuuteks (kontseptuaalne raamistik, 1. tase, vt 2. liide) või kaudsed andmed kemikaali östrogeensuse kohta (2. tase), mille tõttu on vaja uurida, kas selline mõju võib esineda *in vivo*;

— toimed, mis näitavad östrogeensust 4. või 5. tasemel *in vivo* katsetes ja millest selgub, et mõjud on seotud östrogeense mehhanismiga, mida ei saa uurida *in vitro* katses.

13. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

▼M5

KATSE PÕHIMÕTE

14. Uterotroofse biokatse tundlikkuse aluseks on loomkatsesüsteem, milles hüpotalamuse-ajuripatsi-munasarjade telg ei funktsioneeri, mistõttu vereringes on vähe endogeenset östrogeeni. See tagab emaka väikse massi mõjutaja puudumisel (nn nulljoon) ja maksimaalse reageerimise manustatud östrogeenidele. Näriliste emasloomadel esineb sellist östrogeenitundlikku seisundit kahes olukorras:

i) ebaküpsed emasloomad pärast võõrutamist ja enne puberteeti, ning

ii) noored täiskasvanud emasloomad pärast munasarjade eemaldamist, kui on antud piisavalt aega emaka taandarenguks.

15. Uuritavat kemikaali manustatakse iga päev suukaudselt sondiga või naha alla tehtava süstiga. Uuritava kemikaali eri doose manustatakse vähemalt kahele katseloomade doosirühmale (vt punkt 33), kasutades kummaski rühmas oma doositaset ja manustamist kolmel järjestikusel päeval ebaküpsete emasloomade meetodi puhul ja vähemalt kolmel järjestikusel päeval täiskasvanud OVX-emasloomade meetodi puhul. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Östrogeeni agonistide leidmiseks hinnatakse kemikaali saanud loomade keskmist emaka massi ja võrreldakse kandeainet saanud loomade rühma vastava näitajaga, et leida statistiliselt olulist suurenemist. Emaka keskmise massi statistiliselt oluline suurenemine osutab, et kõnealuse biokatse vastus on positiivne.

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

16. Katseloomadena võib kasutada tavaliselt laboris peetavate näriliseliinide loomi. Valideerimiseks kasutati näiteks Wistari ja Sprague-Dawley liini rotte. Ei tohiks kasutada selliste liinide emasloomi, kelle emakas on või arvatakse olevat vähem tundlik. Labor peaks tõendama liini tundlikkust, nagu on kirjeldatud punktides 26 ja 27.

17. Uterotroofseks biokatseks on juba alates 1930. aastatest tavaliselt kasutatud rotte ja hiiri. OECD valideerimisuuringud tehti ainult rottidega, lähtudes arusaamast, et neid liike võib pidada samaväärseks ja seepärast piisab ülemaailmseks valideerimiseks katsetest ühe liigi loomadega, kuna sellega säästetakse vahendeid ja loomi. Rott valitakse katseloomaks enamiku reproduktiiv- ja arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringutes. Arvestades seda, et hiirte kohta on olemas ulatuslik varasema kasutuse andmebaas, ja selleks, et laiendada näriliste uterotroofse biokatse kasutamist ka hiirtele kui katseliigile, tehti piiratud valideerimisuuring hiljem ka hiirtel (16). Kuna peamine soov oli hoida kokku vahendeid ja loomi, valiti võrdlusmeetod, milles kasutati piiratud arvu uuritavaid kemikaale ja osalevaid laboreid ning ei kasutatud koodiga tähistatud näidiste katsetamist. Kõnealune uterotroofse biokatse võrdlev valideerimisuuring näitab, et noorte täiskasvanud OVX-hiirte puhul on rottide ja hiirtega saadud andmed omavahel kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt heas kooskõlas. Kui uterotroofse biokatse tulemus on pikema uuringu eelkatse, võimaldab selline kooskõla kasutada mõlemas uuringus sama liini samast allikast pärinevaid loomi. Võrdleva lähenemisviisi juures piirduti OVX-hiirte kasutamisega ja katsed ei andnud töökindlaid andmeid, mis oleksid võimaldanud valideerida meetodi ka ebaküpsete emasloomade mudeli jaoks, seepärast ebaküpsete hiirte mudelit käesoleva katsemeetodi raames ei vaadelda.

▼M5

18. Seega võib mõnel juhul rottide asemel kasutada hiiri. Hiirte kasutamist tuleks põhjendada, lähtudes toksikoloogilistest, farmakokineetilistest ja/või muudest kriteeriumidest. Hiirte korral võib olla vaja muuta katse-eeskirja. Näiteks kasutavad hiired oma kehamassi kohta rohkem sööta ja seepärast peab sööda fütoöstrogeenisisaldus olema hiirte puhul madalam kui rottide puhul (9, 20, 22).

Pidamis- ja söötmistingimused

19. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kohalikele normidele. Siin esitatud loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele, ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (38), on nende suhtes ülimuslikud. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (ligikaudne vahemik ±3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Eesmärgiks peaks olema suhtelise õhuniiskuse hoidmine 50–60 % vahemikus. Valgustus peaks olema kunstlik. Ööpäevas peaks olema 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

20. Laborisööda ja joogivee tarbimine peaks olema *ad libitum*. Noori täiskasvanud loomi võib hoida puurides eraldi või kuni kolmest loomast koosneva rühmana. Ebaküpsete loomade nooruse tõttu soovitatakse neid pidada puurides sotsiaalsete rühmadena.

21. On teada, et fütoöstrogeenide suur sisaldus laborisöödas suurendab näriliste emaka massi sedavõrd, et see segab uterotroofse biokatse tegemist (13, 14, 15). Fütoöstrogeenide ja metaboliseeritava energia kõrge tase kasutatavas söödas võib ebaküpsete loomade korral põhjustada ka varast puberteeti. Laborisöödas on fütoöstrogeene peamiselt siis, kui söödaks kasutatakse soja- ja lutsernitooteid, ning on näidatud, et fütoöstrogeenide tase võib sõltuda standardse laborisööda partiist (23). Kehamass on oluline muutuja, kuna tarbitav sööda kogus on seotud kehamassiga. Seetõttu võib tegelik saadav fütoöstrogeenide doos sama sööda juures sõltuda loomaliigist ja vanusest (9). Ebaküpsete emasrottide puhul võib sööda tarbimine kehamassi kohta olla ligikaudu kaks korda suurem kui eemaldatud munasarjadega noorte täiskasvanud emasloomade puhul. Noorte täiskasvanud hiirte puhul võib sööda tarbimine kehamassi kohta olla ligikaudu neli korda suurem kui eemaldatud munasarjadega noorte täiskasvanud emasrottide puhul.

22. Uterotroofse biokatse tulemused (9, 17, 18, 19) näitavad siiski, et piiratud koguse fütoöstrogeenide olemasolu söödas on lubatav ja ei vähenda biokatse tundlikkust. Juhinduda tuleks sellest, et söödaga saadav fütoöstrogeenide kogus ei ületaks 350 µg genisteiiniekvivalenti laborisööda grammi kohta ebaküpsete Sprague-Dawley ja Wistari rottide puhul (6, 9). Selline sööt peaks samuti sobima katse tegemisel noorte täiskasvanud OVX-rottidega, kuna nende söödatarbimine kehamassi kohta on väiksem kui ebaküpsetel loomadel. Kui kasutatakse täiskasvanud OVX-hiiri või fütoöstrogeenide suhtes tundlikumaid rotte, tuleb sööda fütoöstrogeenisisaldust vastavalt vähendada (20). Lisaks võivad eri söötade kättesaadava metaboliseeritava energia erinevused põhjustada puberteedi algust eri vanuses (21, 22).

▼M5

23. Enne uuringut tuleb hoolikalt valida sööt, mille fütoöstrogeenide tase ei oleks liiga kõrge (vt juhendid 6, 9) või milles ei oleks liiga palju metaboliseeritavat energiat, mis võib moonutada tulemusi (15, 17, 19, 22, 36). Laboris kasutatava katsesüsteemi õige toimimise tagamine, nagu on täpsustatud punktides 26 ja 27, on oluline mõlema teguri kontrolli alla võtmiseks. Hea laboritava kohane kaitsemeede on võtta uuringu ajal manustatava sööda igast partiist representatiivsed proovid, et oleks võimalik teha fütoöstrogenisisalduse analüüse (nt kui kontrollrühma keskmine emaka mass on suurem kui varasemate kontrollrühmade puhul või kui katsest standardöstrogeeni 17α-etinüülöstradiooliga saadakse ebasobiv tulemus). Uuringu käigus tuleks teha alikvootide analüüs või need külmutada –20 °C juures või säilitada nii, et proovid ei laguneks enne analüüsimist.

24. Mõned allapanumaterjalid võivad sisaldada looduslikult esinevaid östrogeenseid või antiöstrogeenseid kemikaale (nt on teada, et maisitõlvik mõjutab emasrottide tsüklit ja näib olevat antiöstrogeenne). Valitud allapanumaterjal peaks sisaldama võimalikult vähe fütoöstrogeene.

Loomade ettevalmistamine

25. Katseks valitakse loomad, kel ei esine mingeid haigusnähte ega füüsilisi kõrvalekaldeid, ja need jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja doosirühmadesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Loomadele tuleks anda kordumatu märgis. Ebaküpsed loomad peaksid eelistatavalt olema kuni võõrutamiseni puurides koos oma ema või kasuemaga. Kohanemisaeg enne uuringu algust peaks olema umbes 5 päeva noorte täiskasvanud loomade puhul ja ebaküpsete loomade puhul, kes on tarnitud koos oma ema või kasuemaga. Kui ebaküpsed loomad ostetakse ilma emata kohe pärast võõrutamist, võib olla vajalik kasutada lühemat kohanemisaega, kuna dooside manustamine peaks algama kohe pärast võõrutamist (vt punkt 29).

KATSE KORRALDUS

Labori pädevuse kontrollimine

26. Labori pädevuse kontrollimiseks saab kasutada kahte meetodit:

— perioodiline kontrollimine, mille aluseks on algse nulljoone positiivse kontrolli katse (vt punkt 27). Vähemalt iga 6 kuu järel ja iga kord, kui toimub muutus, mis võib mõjutada katse usaldusväärsust (nt uus laborisööda koostis, uus lahkamist teostav isik, loomaliini või loomade tarnija vahetamine jne) tuleks kontrollida katsesüsteemi (loommudeli) tundlikkust, kasutades nulljoone positiivse kontrolli katset, mida on kirjeldatud punktis 27 ja võrdlusöstrogeeni 17α-etinüülöstradiooli (CASi nr 57-63-6) (EE) sobivat doosi;

— samaaegsete kontrollkatsete tegemine, milleks nähakse igas katses ette rühm, kellele manustatakse sobiv doos võrdlusöstrogeeni.

Kui süsteemi reaktsioon ei vasta ootustele, tuleb uurida katsetingimusi ja neid vastavalt muuta. On soovitatav, et kummagi lähenemisviisi puhul kasutatav võrdlusöstrogeeni doos oleks ligikaudu 70–80 efektiivdoosi.

▼M5

27. **Nulljoone positiivse kontrolli katse**. Enne kui labor teeb käesoleva katsejuhendi järgi esimese katse, tuleks tal tõendada oma pädevust. Selleks uuritakse loommudeli reageerimist võrdlusöstrogeeni 17α-etinüülöstradiooli (CASi nr 57-63-6) (EE) vähemalt neljale doosile. Emaka massi suurenemist võrreldakse varasemate kontrollitud andmetega (vt viide 5). Kui kõnealune nulljoone positiivse kontrolli katse ei anna oodatud tulemusi, tuleb katsetingimused üle vaadata ja neid muuta.

Loomade arv ja seisund

28. Igas doosi- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt 6 looma (nii ebaküpse emaslooma kui ka täiskasvanud OVX-emaslooma eeskirja puhul).

Ebaküpsete loomade vanus

29. Ebaküpsete loomade uterotroofse biokatse tegemisel peab olema täpsustatud loomade sünni kuupäev. Dooside manustamisega tuleks alustada piisavalt vara, et uuritava kemikaali manustamise lõpuks ei oleks puberteediga seotud endogeensete östrogeenide taseme tõus veel alanud. Teisest küljest on tõendeid, et väga noored loomad võivad olla vähem tundlikud. Optimaalse vanuse kindlaksmääramiseks peaks iga labor võtma arvesse oma varasemaid tulemusi suguküpsuse saavutamise kohta.

Üldise suunisena võib rottidele dooside manustamist alustada kohe pärast varast võõrutamist, st 18. päeval pärast sündi (sündimise päev loetakse sünnijärgseks päevaks 0). Dooside manustamine rottidele tuleks eelistatult lõpetada 21. sünnijärgsel päeval ja igal juhul enne 25. sünnijärgset päeva, kuna pärast seda päeva hakkab hüpotalamuse-ajuripatsi-munasarjade telg toimima ja endogeensete östrogeenide tase võib hakata tõusma, millele vastavalt hakkab suurenema keskmine nulljoone emaka mass ja rühma standardhälve (2, 3, 10, 11, 12).

Munasarjade eemaldamise kord

30. Eemaldatud munasarjadega rottide ja hiirte saamiseks (doosi- ja kontrollrühmad) tuleb emasloomal eemaldada munasarjad vanuses 6–8 nädalat. Roti puhul peab munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel olema vähemalt 14 päeva, et emakas saaks taandareneda miinimumini ehk stabiilse nulljooneni. Hiire puhul peab munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel olema vähemalt 7 päeva. Kuna östrogeenide taseme tõstmiseks veres piisab juba väiksest kogusest munasarjakoest (3), tuleks loomi enne kasutamist kontrollida tupe-tampooniprooviga saadud epiteliaalrakkude vaatlemisega vähemalt viiel järjestikusel päeval (nt päevad 10–14 pärast roti emaslooma munasarjade eemaldamist). Kui loomal esineb algava östruse tunnuseid, ei tohiks teda katseks kasutada. Lisaks tuleb lahangul uurida munasarjade kunagisi kinnituskohti munasarjakoe leidmiseks. Kui sellist kude leitakse, et tohiks looma andmeid arvutustes kasutada (3).

31. Munasarjade eemaldamiseks loom tuimestatakse korralikult ja pannakse lamama kõhuli. Sisselõige, millega avatakse kõhuõõne dorsolateraalne sein, peaks olema pikkusega umbes 1 cm ja asuma alumise roidekaare ja niudeluuharja vahelise ala keskel ning mõni millimeeter külgmiselt niudelihase välimisest servast. Munasari tuleks eemaldada kõhuõõnest aseptilisele alale. Munasari tuleks eraldada munajuha ja emakakeha kokkupuutekohalt. Kui on tehtud kindlaks, et massiivset verejooksu ei ole, tuleks kõhuõõne sein sulgeda õmblusega ja nahahaav sulgeda klambrite või sobiva õmblusega. Niidiga sidumise kohad on skemaatiliselt näidatud joonisel 1. Tuleb kasutada asjakohast operatsioonijärgset tuimestust, vastavalt näriliste ravis kogenud veterinaararsti soovitustele.

▼M5

Kehamass

32. Täiskasvanud OVX-emaslooma meetodi kasutamisel ei ole kehamass ja emaka mass omavahel seotud, kuna emaka massi mõjutavad hormoonid, nagu östrogeenid, kuid mitte kasvutegurid, mis reguleerivad keha suurust. Seevastu ebaküpse emaslooma kasutamisel on kehamass seotud emaka massiga küpsemise ajal (34). Uuringu alguses peaks loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ega tohiks ebaküpse emaslooma meetodi kasutamisel ületada ±20 % keskmisest kehamassist. See tähendab, et loomade kasvataja peaks standardima pesakonna suuruse, et eri emasloomade järglased saaksid umbes ühepalju toitu. Loomad tuleks jaotada (kontroll- ja doosi)rühmadesse kehamassi varieeruvuse järgi juhuvaliku alusel, nii et iga rühma keskmine kehamass ei oleks statistiliselt erinev muu rühma vastavast näitajast. Tuleks jälgida, et sama pesakonna liikmeid ei määrataks samasse doosirühma, kuivõrd see on võimalik ilma uuringus kasutatavate pesakondade arvu suurendamiseta.

Doseerimine

33. Selleks et teha kindlaks, kas uuritaval kemikaalil võib *in vivo* olla östrogeenset toimet, piisab tavaliselt kahest doosirühmast ja ühest kontrollrühmast; seepärast eelistatakse sellist katse kava loomade heaoluga seotud põhjustel. Kui eesmärk on saada doosi ja toime vahelise sõltuvuse kõver või ekstrapoleerida toimet madalamatele doosidele, on vaja vähemalt 3 doosirühma. Kui on vaja ka muud teavet peale östrogeense toime kindlakstegemise (näiteks hinnata mõju tugevust), tuleks kaaluda teistsugust dooside manustamise režiimi. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava aine manustamisel kasutatakse kandeainet, peaks kontrollrühm saama doosirühmadega võrdses koguses kandeainet (või kui doosirühmades kasutatakse erinevaid koguseid, siis neist suurima koguse).

34. Uterotroofse biokatse puhul on eesmärk valida doosid, mis tagaksid loomade ellujäämise ning mis ei oleks oluliselt mürgised ega põhjustaks loomadele erilist stressi pärast uuritava kemikaali manustamist kolmel järjestikusel päeval maksimumdoosiga kuni 1 000 mg/kg/päevas. Kõikide doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellega seotud materjalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Kõrgeima doosimäära puhul tuleks kõigepealt arvestada LD50 väärtust ja/või andmeid ägeda mürgisuse kohta, et vältida loomade surma, suuri kannatusi ja stressi (24, 25, 26). Suurim doos peaks vastama suurimale talutavale doosile; uuringu võib teha ka doosi suuruse juures, mis põhjustab positiivse uterotroofse reaktsiooni. Kuna see on sõelkatse, siis võib üldiselt kasutada suuri dooside intervalle (näiteks 0,5 logaritmilist ühikut, mis vastab dooside 3,2-kordsele erinevusele, või isegi kuni 1 logaritmiline ühik). Kui vajalikke andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside leidmise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse.

35. Teiselt poolt, kui agonisti östrogeenseid omadusi on võimalik hinnata *in vitro* (või *in silico*) andmetest, võib neid doosi valimisel arvesse võtta. Näiteks määratakse uuritava kemikaali kogus, mis uterotroofses biokatses põhjustab võrdlusagonisti (etinüülöstradiool) mõjuga ekvivalentse reaktsiooni, tema suhtelise tõhususe järgi *in vitro*, võrreldes etinüülöstradiooliga. Kõrgeim katses kasutatav doos leitakse selle ekvivalentse doosi korrutamisel sobiva teguriga, näiteks 10 või 100ga.

▼M5

Vahemiku leidmise kaalutlused

36. Vajaduse korral võib väikse arvu loomadega teha esialgse uuringu doosivahemiku leidmiseks. Selleks võib kasutada OECD juhenddokumenti nr 19 (25), milles on määratletud mürgisusele või looma stressile osutavad kliinilised tunnused. Kui see on doosivahemiku leidmise uuringus teostatav, võib emakad pärast kolmepäevast kemikaali manustamist välja lõigata ja kaaluda ligikaudu 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Neid andmeid võiks seejärel kasutada põhiuuringu kava koostamiseks (et valida sobivad suurim ja väiksem doos ja vajalik doosirühmade arv).

Dooside manustamine

37. Uuritavat kemikaali manustatakse suukaudselt sondiga või naha alla tehtava süstiga. Manustamistee valimisel tuleb arvestada loomade heaolu kaalutlusi, toksikoloogia aspekte (kuivõrd asjakohane on teatav manustamistee, arvestades inimese kemikaaliga kokkupuute viise (nt suukaudne sond vastab allaneelamisele, nahaalused süstid sissehingamisele või naha kaudu imendumisele), uuritava materjali füüsikalisi ja keemilisi omadusi ning eriti olemasolevaid toksikoloogilisi andmeid ning andmeid metabolismi ja kineetika kohta (nt vajadus vältida presüsteemset metabolismi, suurem tõhusus teatava manustamistee korral).

38. Soovitatav on võimaluse korral kõigepealt kaaluda manustamist vesilahusena või suspensioonina vees. Kuid kuna enamik östrogeenseid ligande või nende metaboolseid eellasi on hüdrofoobsed, kasutatakse kõige sagedamini lahust või suspensiooni õlis (nt maisi, maapähkli-, seesami- või oliiviõli). Need õlid on eri kalorsuse ja rasvasisaldusega, seega võib kandeaine mõjutada üldist metaboliseeritava energia omastamist, mille tõttu võivad muutuda mõõdetavad näitajad, nagu emaka mass, eeskätt ebaküpse emaslooma meetodi puhul (33). Seepärast tuleb enne uuringut katsetada kandeainet ja võrrelda kontrollrühmaga, kellele ei anta kandeainet. Uuritava kemikaali võib lahustada minimaalses koguses 95 % etanoolis või muus sobivas lahustis ja lahjendada lõpliku töökontsentratsioonini katses kasutatavas kandeaines. Lahusti toksilised omadused peavad olema teada ning need tuleks välja selgitada eraldi kontrollrühmaga, kellele manustatakse üksnes lahustit. Kui uuritavat kemikaali peetakse stabiilseks, võib selle lahustamise hõlbustamiseks kasutada ettevaatlikku soojendamist ja tugevat segamist. Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kui uuritav kemikaal on stabiilne kogu uuringu jooksul, võib valmistada uuritava kemikaali lähtealikvoodi ja teha sellest iga päev vajalikud lahjendused.

39. Doosi manustamise ajastus sõltub kasutatavast mudelist (vt punkt 29, ebaküpse emaslooma mudel, ja punkt 30, täiskasvanud OVX-emaslooma mudel). Ebaküpsetele emasrottidele manustatakse uuritavat kemikaali iga päev kolmel järjestikusel päeval. Kolmepäevast dooside manustamist soovitatakse ka täiskasvanud OVX-emasrottide puhul, kuid sel juhul on lubatav ka pikem kokkupuude ja nii saab paremini avastada nõrga toimega kemikaale. Täiskasvanud OVX-emashiirte puhul peaks 3-päevane manustamine olema piisav ja manustamise pikendamisel seitsme päevani ei ole tugevate östrogeeniagonistide puhul erilisi eeliseid, kuid valideerimisuuringus näidati, et nõrkade agonistidega see nii ei ole (16), seepärast tuleks OVX-emashiirte puhul pikendada dooside manustamist kuni 7 järjestikuse päevani.Doos tuleks manustada iga päev samal kellaajal. Doose tuleks vajaduse korral kohandada, et säilitada konstantset doosimäära looma kehamassi suhtes (nt mg uuritavat kemikaali ühe kg kehamassi kohta päevas). Katses kasutatava lahuse mahu muutumine tuleks hoida minimaalne; tuleks muuta uuritava aine lahuse kontsentratsiooni, et tagada ühesugune lahuse maht kehamassi suhtes kõikide dooside ja manustamisviiside puhul.

▼M5

40. Kui uuritavat kemikaali manustatakse loomadele sundsöötmisega, tuleks seda teha ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Suurim vedeliku maht, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Tuleb järgida kohalikke loomakaitse eeskirju, kuid lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada kuni 10 ml kehamassi kg kohta.

41. Kui uuritavat kemikaali manustatakse nahaaluse süstiga, tuleks päevane doos manustada üheainsa süstiga. Doose tuleks manustada selja abaluu- või nimmepiirkonda steriilse nõela (kaliiber näiteks 23 või 25) ja tuberkuliinisüstlaga. Soovi korral võib süstimiskoha puhtaks raseerida. Registreerida tuleks lahuse kaod, süstekohast väljaimbumine või doosi mittetäielik manustamine. Rotile päevas süstitav lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, mis jagatakse kahe süstekoha vahel; vesilahuste puhul võib erandina süstida 10 ml kehamassi kg kohta.

Vaatlused

Üld- ja kliinilised vaatlused

42. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas ja sagedamini, kui ilmneb toksilisuse märke. Vaatlusi oleks soovitatav teha iga päev samal ajal, võttes arvesse oodatava maksimaalse mõju avaldumise aega pärast doosi manustamist. Kõigi loomade puhul jälgitakse suremust, haigestumust ja selliseid kliinilisi tunnuseid nagu käitumise, naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine).

Kehamass ja sööda tarbimine

43. Kõiki loomi tuleks kaaluda iga päev täpsusega 0,1 g, alustades hetkest enne esimese doosi manustamist, st kui loomad on juba jagatud rühmadesse. Lisaks võib mõõta dooside manustamise aja jooksul igas puuris tarbitud sööda koguse söötmisseadmete kaalumisega. Sööda tarbimise tulemused väljendatakse grammides ühe roti kohta päevas.

Lahkamine ja emaka massi mõõtmine

44. Kakskümmend neli tundi pärast viimase doosi manustamist rotid surmatakse humaanselt. Ideaaljuhul tuleks kõikide rühmade liikmete lahkamised teha juhuslikus järjekorras, et vältida kõige alguses või kõige lõpus ühe või teise rühma liikmete lahkamist, mis võiks andmeid natuke mõjutada. Biokatse eesmärk on mõõta nii märja emaka kui ka kuivatatud emaka mass. Märgmass hõlmab emaka ja selle valendikus oleva vedeliku massi. Kuivatatud emaka mass mõõdetakse pärast selle valendikus oleva vedeliku väljapigistamist ja kõrvaldamist.

45. Ebaküpsete emasloomade puhul uuritakse enne lahkamist tuppe, et teha kindlaks tupe võimalik avanemine. Lahkamist alustatakse kõhuseina avamisega alates häbemeliidusest. Seejärel eemaldatakse emakasarved ja munasarjad, kui viimased on olemas, kõhuõõne dorsaalse seina küljest. Emaka ja tupe ventraalselt ja lateraalselt küljelt eemaldatakse kusepõis ja kusejuhad. Kiulised ühendused päraku ja tupe vahel eraldatakse, kuni võib näha tupesuudme ja lahkliha naha ühenduskohta. Emakas ja tupp eraldatakse kehast tupeseina läbilõikamisega otse lahklihanahaga ühenduse kohalt, nagu on näidatud joonisel 2. Emakas tuleks kõhuseinast eraldada emaka kinnisti (mesenteeriumi) ettevaatliku läbilõikamisega selle kinnituskohalt kummagi

▼M5

emakasarve dorsolateraalse külje kogu pikkuses. Pärast kehast eemaldamist tuleks emakat käsitseda piisavalt kiiresti, et vältida kudede kuivamist. Massikadu kuivamise tõttu muutub olulisemaks just väikeste kudede nagu emaka puhul (23). Kui munasarjad on alles, eemaldatakse need munajuha juurest, vältides valendikus oleva vee väljavoolamist emakasarvest. Kui loomal on munasarjad eemaldatud, tuleks munasarjade kunagisi kinnituskohti uurida munasarjakoe leidmiseks. Liigne rasv ja sidekude tuleks ära lõigata. Tupp eraldatakse emakast veidi allpool emakakaela, nii et emakakael jääb emakakeha juurde, nagu on näidatud joonisel 2.

46. Iga emakas tuleks paigutada kordumatu märgisega teadaoleva massiga anumasse (nt Petri tass või plastikust kaalumisnõu), jälgides kogu aeg, et koed ei enne kaalumist ära ei kuivaks (nõusse võib panna näiteks soolalahusega kergelt niisutatud filterpaberi). Emakas koos valendikus oleva vedelikuga kaalutakse täpsusega 0,1 mg (märja emaka mass).

47. Seejärel töödeldakse eraldi iga emakat, et eemaldada valendikus olev vedelik. Mõlemad emakasarved torgatakse läbi või lõigatakse pikuti lõhki. Emakas pannakse kergelt niisutatud filterpaberile (nt Whatman nr 3) ja pressitakse kergelt teise kergelt niisutatud filterpaberiga valendikus oleva vedeliku täielikuks eemaldamiseks. Emakas ilma valendikus oleva vedelikuta kaalutakse täpsusega 0,1 mg (kuivatatud emaka mass).

48. Katse lõpetamisel määratud emaka massi võib kasutada selle tõendamiseks, et ebaküpse opereerimata roti katses kasutamise sobivat vanust ei ületatud, kuid laboris kasutatava rotiliini varasemad andmed on selles suhtes otsustava tähtsusega (vt tulemuste tõlgendamine, punkt 56).

Vabavalikulised uuringud

49. Pärast kaalumist võib emaka fikseerida neutraalse puhvriga 10 % formaliinilahuses, et seda saaks histopatoloogiliselt uurida pärast värvimist hematoksüliini ja eosiiniga. Ka tuppe võib samal viisil uurida (vt punkt 9). Lisaks võib teha morfomeetrilise mõõtmise endomeetriumi epiteeli kvantitatiivseks võrdlemiseks.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

50. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist:

— loomade arv katse alguses,

— surnuna leitud või katse jooksul humaansetel põhjustel surmatud loomade arv ja koodnumbrid ning iga looma surma või humaanse surmamise kuupäev ja kellaaeg,

— mürgistustunnustega loomade arv ja koodnumbrid ning tunnuste kirjeldus, sealhulgas toksilise toime täheldatud algushetk, kestus ja raskusaste, ning

— kahjustustega loomade arv ja koodnumbrid ning kahjustuste tüübi kirjeldus.

▼**M5**

51. Iga looma kohta registreeritakse kehamass, märja emaka mass ja kuivatatud emaka mass. Selleks, et teha kindlaks, kas uuritava kemikaali manustamine põhjustas statistiliselt olulise ($p < 0,05$) emaka massi suurenemise, tuleks agonistide puhul kasutada ühepoolset statistilist analüüsi. Kuivatatud emaka massi ja märja emaka massi suurenemist tuleks analüüsida asjakohaste statistiliste meetoditega, et kindlaks teha kemikaali manustamisega seotud suurenemine. Näiteks võib andmeid hinnata kovariatsioonianalüüsi (ANCOVA) lähenemisviisi abil, kus kaasmuutujaks on kehamass lahkamise ajal. Enne andmete analüüsi võib emaka andmed logaritmiliselt teisendada dispersiooni stabiilsuse suurendamiseks. Iga doosirühma paariviisiliseks võrdlemiseks kontrollrühmaga ja usaldusvahemiku leidmiseks sobivad Dunnetti ja Hsu test. Võimalike võõrväärtuste leidmiseks ja dispersiooni homogeensuse hindamiseks võib kasutada jääkhälvete töötlemist Studenti teljestikus. Neid meetodeid kasutati OECD valideerimisuuringus, milles kasutati statistilise analüüsi süsteemi programmi PROC GLM (SAS Institute, Cary, NC), versioon 8 (6, 7).

52. Lõpp-protokollis esitatakse järgmine.

Uurimislabor:

— vastutavad töötajad ja nende kohustused uuringu tegemisel;

— nulljoone positiivse kontrolli andmed ja perioodilise positiivse kontrolli andmed (vt punktid 26 ja 27).

Uuritav kemikaal:

— uuritava kemikaali iseloomustus;

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— lahjenduste valmistamise meetod ja sagedus;

— kõik andmed, mis on saadud püsivuse kohta;

— kõik manustamislahuste analüüsid.

Kandeaine:

— kandeaine iseloomustus (olek, tarnija ja partii);

— kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad:

— liik, liin ja nende valimise põhjendus;

— tarnija ja tema konkreetne käitis;

— loomade vanus tarnimise ajal ja sünnikuupäev;

— ebaküpsete loomade puhul: kas tarniti koos ema või kasuemaga ja võõrutamise kuupäev;

— loomade kohanemise korra üksikasjad;

— loomade arv puuris;

— üksiklooma ja rühma märgistamise üksikasjad ja meetod.

Katse tingimused:

— randomiseerimise üksikasjad (st kasutatud juhuvaliku meetod);

— doosi valimise põhjendused;

▼M5

— uuritava kemikaali doseerimisvormi üksikasjad, saavutatud kontsentratsioon, stabiilsus ja homogeensus;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad ja kokkupuuteviisi valiku põhjendus;

— sööt (nimetus, tüüp, tarnija, koostis ja, kui see on teada, fütoöstrogeenide sisaldus);

— vee päritolu (nt kraanivesi või filtritud vesi) ja loomadele kättesaadavaks tegemine (torude kaudu suurest mahutist, pudelitest jne);

— allapanu (nimetus, tüüp, tarnija ja koostis);

— puurides pidamise tingimused, valgustusaeg, ruumi temperatuur ja õhuniiskus, ruumi koristamine;

— lahkamise ja emaka kaalumise korra üksikasjalik kirjeldus;

— statistiliste töötluste kirjeldus.

Tulemused

Iga looma kohta:

— iga looma kehamass igal päeval (rühmadesse jagamisest kuni lahkamiseni) (täpsusega 0,1 g);

— iga looma vanus (päevades, lugedes sündimise päeva 0-päevaks) selleks ajaks, kui algas uuritava kemikaali manustamine;

— iga doosi manustamise kuupäev ja kellaaeg;

— manustatud doosi suurus ja arvutatud ruumala ning kõik tähelepanekud kadude kohta doosi manustamisel või pärast manustamist;

— igapäevased andmed looma olukorra kohta, kõik asjakohased sümptomid ja tähelepanekud;

— oletatav surma põhjus (kui loom uuringu ajal oli suremas või suri);

— humaanse surmamise kuupäev ja kellaaeg ning ajavahemik pärast viimast manustamist;

— märja emaka mass (täpsusega 0,1 mg), tähelepanekud valendikus olnud vedeliku kadude kohta lahkamise ja kaalumiseks ettevalmistamise ajal;

— kuivatatud emaka mass (täpsusega 0,1 mg).

Iga loomade rühma kohta:

— keskmine kehamass igal päeval (täpsusega 0,1 g) ja standardhälbed (rühmadesse määramisest kuni lahkamiseni);

— keskmine märja emaka mass ja keskmine kuivatatud emaka mass (täpsusega 0,1 mg) ja standardhälbed;

— kui mõõdeti, siis igapäevane sööda tarbimine (arvutatuna tarbitud sööda grammides looma kohta);

▼M5

— statistilise analüüsi tulemused, milles on võrreldud märja emaka ja kuivatatud emaka massi doosirühmades ja kandeainet saanud rühmades;

— statistilise analüüsi tulemused, milles on võrreldud doosirühmade loomade üldist kehamassi ning kehamassi suurenemist märja emaka ja kuivatatud emaka massiga ja kõrvutatud neid tulemusi kandeainet saanud kontrollrühmade asjaomaste näitajatega.

53. Katsemeetodi oluliste suunavate faktide kokkuvõte

	Rott	**Hiir**
Loomad		
Liin	Tavaliselt kasutatav laborinäriliste liin	
Loomade arv	Vähemalt 6 looma ühes doosirühmas	
Rühmade arv	Vähemalt 2 doosirühma (vt punkt 33 juhiste saamiseks) ja negatiivne kontrollrühm Vt punktid 26 ja 27, juhised positiivse kontrollkatse rühmade kohta	
Pidamis- ja söötmistingimused		
Loomade ruumi T°	22 °C ± 3 °C	
Suhteline õhuniiskus	50–60 %, mitte alla 30 % ega üle 70 %	
Ööpäeva valgustusrežiim	12 tundi valgust, 12 tundi pimedust	
Sööt ja joogivesi	Ad libitum	
Majutus puurides	Üksi või kuni kolmest loomast koosnevate rühmadena (ebaküpseid loomi soovitatakse pidada sotsiaalsete rühmadena)	
Sööt ja allapanu	Sööda ja allapanu fütoöstrogeenide sisaldus peaks olema väike	
Katse-eeskiri		
Meetod	Ebaküpsete eemaldamata munasarjadega loomade meetod (eelistatud valik). Eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emasloomade meetod	Eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emasloomade meetod
Ebaküpsete loomade vanus dooside manustamisel	Vähemalt PND 18. Dooside manustamine tuleb lõpetada enne päeva PND 25.	Praeguse meetodi puhul ei ole asjakohane.
Vanus munasarjade eemaldamisel	Vanuses 6–8 nädalat.	
Eemaldatud munasarjadega loomade vanus dooside manustamisel	Munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel peaks olema vähemalt 14 päeva.	Munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel peaks olema vähemalt 7 päeva.
Kehamass	Kehamassi erinevused peaksid olema minimaalsed, mitte üle ±20 % keskmisest kehamassist	

▼M5

	Rott	Hiir
Doseerimine		
Manustamistee	Suukaudne sond või nahaalune süst	
Manustamise sagedus	Ühekordne päevane doos	
Sondiga ja süstimisega manustatav ruumala	≤ 5 ml kehamassi kg kohta (või vesilahuste puhul kuni 10 ml kehamassi kg kohta) (kahte süstimiskohta nahaaluse manustamise puhul)	
Manustamise kestus	Ebaküpsete loomade puhul 3 järjestikusel päeval OVX-loomade puhul vähemalt 3 järjestikusel päeval	OVX-loomade puhul 7 järjestikusel päeval
Lahkamisaeg	Ligikaudu 24 tundi pärast viimast doosi	
Tulemused		
Positiivne vastus	Keskmise emakamassi statistiliselt oluline suurenemine (märja ja/või kuivatatud emaka mass)	
Võrdlusöstrogeen	17α-etinüülöstradiool	

TULEMUSTE TÕLGENDAMISE JA KEHTIVAKS TUNNISTAMISE JUHISED

54. Üldiselt tuleks östrogeensuse test lugeda positiivseks, kui tuvastatakse statistiliselt oluline emakamassi suurenemine ($p < 0,05$) vähemalt suure doosi rühmas, võrreldes lahusti kontrollrühmaga. Positiivset tulemust toetab täiendavalt bioloogiliselt usutav sõltuvus doosi ja toime ulatuse vahel, pidades aga silmas, et uuritava kemikaali kattuvad östrogeensed ja antiöstrogeensed toimed võivad mõjutada uuritava kemikaali doosi-toime sõltuvuse kuju.

55. Tuleb jälgida, et ei ületataks suurimat talutavat doosi, et andmeid oleks võimalik mõistlikult tõlgendada. Selles suhtes tuleks hoolikalt hinnata kehamassi vähenemist, kliinilisi tunnuseid ja muid tähelepanekuid.

56. Oluline asjaolu uterotroofse biokatse tulemuste kehtivaks tunnistamisel on emaka mass kandeaine kontrollrühma liikmetel. Suur emaka mass kontrollrühma liikmetel võib panna kahtluse alla biokatse tundlikkuse ja võime tuvastada väga nõrku östrogeeni agoniste. Kirjandusülevaated ja uterotroofse biokatse valideerimise käigus kogutud andmed osutavad, et kontrollrühma emakamassi kõrge keskmine esineb spontaanselt, eriti ebaküpsete loomade puhul (2, 3, 6, 9). Kuna ebaküpse roti emaka mass sõltub mitmest muutujast, nagu stress või kehamass, ei ole võimalik anda kindlat emaka massi ülempiiri. Juhindumiseks: kui ebaküpsete rottide kontrollrühmas emaka mass on 40–45 mg, tuleks tulemusi pidada kahtlaseks, ja emaka mass üle 45 mg võib tähendada, et katset tuleks korrata. Siiski tuleb seda kaalutleda iga juhtumi puhul eraldi (3, 6, 8). Täiskasvanud rottidega katsete tegemisel võib munasarjade puudulikul eemaldamisel jääda alles munasarjakude, mis võib nõristada endogeenseid östrogeene ja aeglustada emakamassi taandarengut.

▼M5

57. Kandeaine kontrollrühma kuivatatud emaka mass, mis on väiksem kui 0,09 % roti ebaküpse emaslooma kehamassist ja väiksem kui 0,04 % roti eemaldatud munasarjadega noore täiskasvanud emaslooma kehamassist, näib andvat vastuvõetavaid tulemusi (vt tabel 31 (2)). Kui kontrollrühmas on emaka mass suurem kui kõnealused arvud, tuleks analüüsida eri tegureid, nagu loomade vanus, munasarjade eemaldamise nõuetekohasus, söödaga saadavad fütoöstrogeenid jne), ja katse negatiivset tulemust (östrogeense toime puudumine) tuleks võtta ettevaatusega.

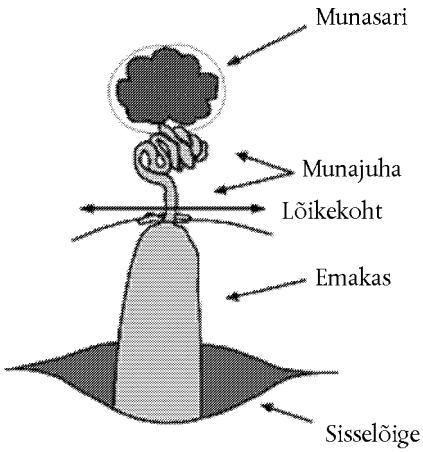
58. Laboris tuleks säilitada võrdlusrühmade kohta kogutud varasemad andmed. Samuti tuleks laboris säilitada andmed selliste võrdlusöstrogeenide nagu 17α-etinüülöstradiool poolt esilekutsutud reaktsiooni kohta. Labor võib teha katseid ka teadaolevalt nõrga östrogeeni agonisti reaktsiooni määramiseks. Kõiki neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate andmetega (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), et veenduda selles, et labori meetod on piisavalt tundlik.

59. Kuivatatud emaka massi varieeruvus oli OECD valideerimisuuringus väiksem kui märja emaka massi puhul (6, 7). Kuid kummagi näitaja väärtuste tugev suurenemine viitab siiski sellele, et uuritav aine on östrogeense toime poolest positiivne.

60. Uterotroofne reaktsioon ei ole täielikult östrogeense päritoluga, kuid uterotroofse biokatse positiivset tulemust tuleks üldiselt tõlgendada kui tõendit võimaliku östrogeensuse kohta *in vivo*, ja see peaks tavaliselt andma põhjust selle küsimuse edasiseks täpsustamiseks (vt punkt 9 ning „Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik”, 2. lisa).

Joonis 1

Skeem munasarjade kirurgilise eemaldamise kohta



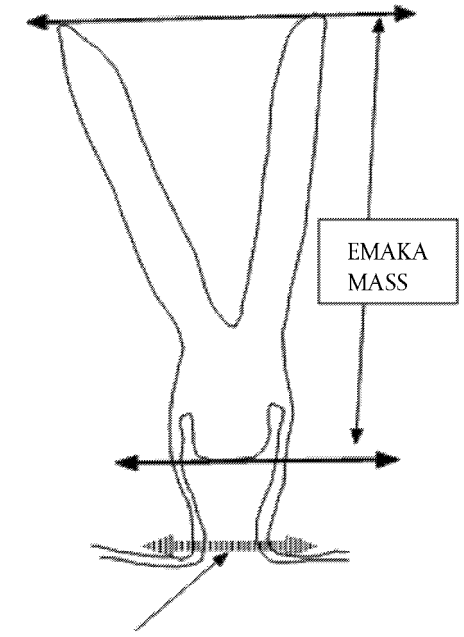
Mesomeetriumi, veresooni ega rasvpadjandit ei ole näidatud

Operatsioon algab kõhuõõne dorsolateraalse seina avamisega alumise roidekaare ja niudeluuharja vahelise ala keskpunktis ning mõne millimeetri kaugusel niudelihase välimisest servast. Kõhuõõnes tuleks leida munasarjad. Munasarjad eemaldatakse seejärel füüsiliselt kõhuõõnest aseptilisele alale, munasarja ja emaka vahele pannakse ligatuur verejooksu vältimiseks ning munasari eemaldatakse sisselõikega ligatuuri kohalt kummagi munajuha ja emakasarve ühinemiskohast. Kui on tehtud kindlaks, et olulist püsivat verejooksu ei ole, tuleks kõhuõõne sein sulgeda õmblusega ja nahahaav sulgeda klambrite või õmblusega. Loomadel lastakse paraneda ja emakal taandareneda vähemalt 14 päeva enne katses kasutamist.

▼**M5**

Joonis 2

Emakakudede eemaldamine ja ettevalmistamine massi määramiseks.



Tööd alustatakse kõhuseina avamisega alates häbemeliidusest. Seejärel eraldatakse kumbki munasari ja emakasarv kõhuõõne dorsaalse seina küljest. Emaka ja tupe ventraalselt ja lateraalselt küljelt eemaldatakse kusepõis ja kusejuhad. Kiulised ühendused päraku ja tupe vahel eraldatakse, kuni võib näha tupesuudme ja lahkliha naha ühenduskohta. Emakas ja tupp eraldatakse kehast tupeseina läbilõikamisega otse lahklihanahaga ühenduse kohalt, nagu on näidatud joonisel. Emakas tuleks kõhuseinast eraldada emaka kinnisti (mesenteeriumi) ettevaatliku läbilõikamisega selle kinnituskohalt kummagi emakasarve dorsolateraalse külje kogu pikkuses. Pärast emaka eemaldamist lõigatakse ära liigne rasv ja sidekude. Kui munasarjad on alles, eemaldatakse need munajuha juurest, vältides valendikus oleva vee väljavoolamist emakasarvest. Kui loomal on munasarjad eemaldatud, tuleks munasarjade kunagisi kinnituskohti uurida munasarjakoe leidmiseks. Tupp eraldatakse emakast veidi allpool emakakaela, nii et emakakael jääb emakakeha juurde, nagu on näidatud joonisel. Emaka võib seejärel kaaluda.

▼M5

1. liide

MÕISTED

Antiöstrogeensus – kemikaali võime alla suruda 17ß-etinüülöstradiooli toimet imetajate organismile.

Doos – manustatav uuritava kemikaali kogus. Uterotroofse biokatse puhul väljendatakse doosi uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (nt mg kehamassi kg kohta päevas).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, dooside manustamise sagedust ja kestust.

Kemikaal – aine või segu.

Maksimaalne talutav doos(*Maximum Tolerable Dose*, MTD) – suurim kemikaali kogus, mis katselooma kehasse viiduna ei põhjusta katselooma surma (tähis LD_0) (IUPAC, 1993).

Spetsiifilisus – kõikide negatiivsete/toimeta ainete osakaal, mis katsemeetodi abil klassifitseeritakse õigesti. See on tõhususe näitaja katsemeetodi puhul, mis näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel.

Sünnijärgne päev X – X. elupäev pärast sünnikuupäeva.

Sünnikuupäev – sünnijärgne päev 0 (PND 0).

Tundlikkus – kõikide positiivsete/toimivate ainete osakaal, mis klassifitseeritakse katsemeetodi abil õigesti. Tundlikkus näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel.

Uterotroofne – termin, millega kirjeldatakse positiivset mõju emaka kudede kasvule.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Östrogeensus – kemikaali võime avaldada imetaja organismile 17ß-etinüülöstradiooli omaga sarnanevat toimet.

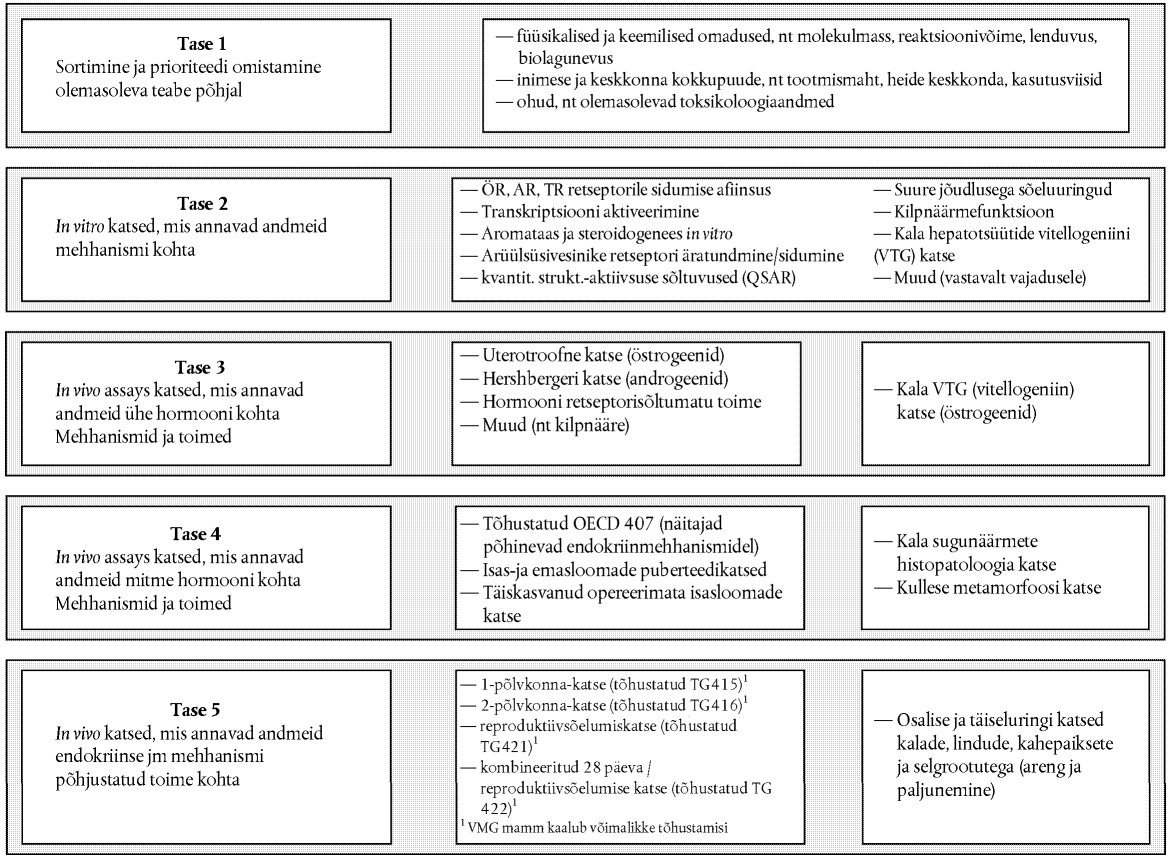
Valideerimine – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

▼M5

2. liide

Märkus: dokumendi on koostanud juhenddokumentide programmi sekretariaat vastavalt kokkuleppele, mis saavutati EDTA töörühma 6. koosolekul

Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik



VMG mamm: imetajatega tehtavate katsete valideerimist ja hindamist juhtiv rühm

▼**M5**

MÄRKUSED RAAMISTIKU JUURDE

Märkus 1: kõigile tasemetele on võimalik siseneda ja kõigilt tasemetelt on võimalik väljuda; see oleneb sellest, millist teavet on vaja saada ohtude ja riskide hindamiseks.

Märkus 2: tasemel 5 peaks ökotoksikoloogia hõlmama näitajaid, mis näitavad kahjuliku mõju mehhanisme ja võimalikku kahju elanikkonna jaoks.

Märkus 3: kui mitme näitaja kohta tulemusi andev katsemudel hõlmab näitajaid, mida määratakse ühe näitaja kohta tulemusi andva katsega, peaks nimetatud mudel asendama ühe näitaja kohta tulemusi andva katsed.

Märkus 4: iga kemikaali tuleks eraldi hinnata, võttes arvesse kogu olemasolevat teavet ja pidades silmas raamistiku tasemete funktsiooni.

Märkus 5: praegust raamistikku ei tuleks käsitleda kõike hõlmavana. Tasemetel 3, 4 ja 5 hõlmab raamistik katseid, mis on juba kättesaadavad või valideerimine on käimas. Viimast asjaolu arvestades on need ajutiselt lisatud. Kui need on välja töötatud ja valideeritud, saab need ametlikult lisada raamistikku.

Märkus 6: raamistikust ei tohiks niimoodi aru saada, et tasemel 5 on üksnes lõplikud katsed. Arvestatakse, et osutatud tasemel olevad katsed aitavad kaasa üldisele ohtude ja riskide hindamisele.

▼M5

KIRJANDUS

1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445–520.

4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/-MONO(2006)33.

5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785–94.

6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549

8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.

9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582–587.

11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.

12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10–15.

13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650–651.

14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425–427.

15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369–373.

▼M5

16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145–157.

18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517-1525.

19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613–620.

20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477–485.

21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol.20:343–347.

22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381–393.

23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37:596–601.

24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320 — 333.

28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33 — 41.

29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288 — 305.

30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284 — 291.

31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92–64-12367-9, Paris.

32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401–416.

▼**M5**

34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1–2): 159–184.

35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807-1808.

36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.

37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. No. 71.

38) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

▼M5

B.55. **HERSHBERGERI BIOKATSE ROTTIDEL: KIIRE SÕELKATSE (ANTI)ANDROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 441 (2009). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (1). Üks tegevussuund oli töötada välja rotiga tehtava Hershbergeri biokatse juhend. Pärast mitme aastakümne pikkust kasutamist ravimitööstuses standarditi see katse kõigepealt ametliku ekspertdikomitee poolt 1962. aastal sõelkatsena androgeense toimega kemikaalide väljaselgitamiseks (2). Aastatel 2001–2007 läbis rotiga tehtav Hershbergeri biokatse ulatusliku valideerimisprogrammi, mille käigus koostati üksikasjalik taustadokument (23), põhjalik artikkel (3) meetodite kohta, arendati välja lahkamise juhendid (21) ning tehti ulatuslikud laborisisesed ja laboritevahelised uuringud, et näidata biokatse asjakohasust ja reprodutseeritavust. Nimetatud uuringud viidi läbi tugeva võrdlusandrogeeniga (testosteroonpropionaat (TP)), kahe tugeva sünteetilise androgeeniga (trenboloonatsetaat ja metüültestosteroon), ühe tugeva antiandrogeense ravimiga (flutamiid), loodusliku androgeeni (dihüdrotestosteroon, DHT) sünteesi tugeva inhibiitoriga (finasteriid), mitme nõrgalt antiandrogeense pestitsiidiga (linuroon, vinklosoliin, protsümidoon, *p,p'*-DDE), tugeva 5α-reduktaasi inhibiitoriga (finasteriid) ja kahe teadaoleva toimeta (negatiivse) kemikaaliga (dinitrofenool ja nonüülfenool) (4, 5, 6, 7, 8). Käesolevas katsemeetodis on võetud kokku pikaajaliste biokatsega saadud kogemused ning valideerimisprogrammi käigus saadud kogemused ja saavutatud tulemused.

2. Hershbergeri biokatse on kiire *in vivo* sõelkatse, milles kasutatakse isassuguorganite kudesid. Katse töötati välja 1930. aastatel ja 1940. aastatel seda muudeti, et lisada ka isassuguorganite androgeenitundlikud lihased (2, 9–15). 1960. aastatel hinnati katse-eeskirja standarditud versiooni kasutades enam kui 700 võimalikku androgeeni (2, 14); sel ajal peeti seda katset nii androgeenide kui ka antiandrogeenide määramise standardmeetodiks (2, 15). Praegune biokatse põhineb enne puberteeti kastreeritud isasrottide viie androgeenisõltuva koe massi muutustel. Sellega hinnatakse, kas kemikaal kutsub esile bioloogilisi toimeid, mis on kooskõlas androgeeni agonistide, antagonistide või 5α-reduktaasi inhibiitorite toimega. Viis androgeenisõltuvat kude, mida hõlmab käesolev katsemeetod, on ventraalne eesnääre (*ventral prostate*, VP), seemnepõis (*seminal vesicle*, SV) (pluss vedelikud ja koagulatsiooninäärmed), lihas *levator ani-bulbocavernosus* (LABC), paarilised Cowperi näärmed (COW) ja suguti pea (*glans penis*, GP). Enne puberteeti kastreeritud isasrottidel reageerivad kõik need viis kude androgeenidele absoluutse massi suurenemisega. Samas kui nende kudede stimuleerimine tugeva võrdlusandrogeeniga suurendab nende massi, väheneb kõigi nende viie koe mass antiandrogeenide toimel. Hershbergeri biokatse esmane mudel oli enne puberteeti kirurgiliselt kastreeritud isasrott; seda mudelit valideeriti Hershbergeri valideerimisprogrammide etappidel 1, 2 ja 3.

3. Biokatset saab kasutada androgeeni agonistide, antagonistide ja 5α-reduktaasi inhibiitorite rutiinseks *in vivo* sõeluuringuks ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” (2. liide) kontekstis. Selles

▼M5

kontseptuaalses raamistikus on Hershbergeri biokatse 3. tasemel kui *in vivo* katse, mis annab andmeid üheainsa sisesekretsioonimehhanismi, nimelt (anti)androgeensuse kohta. Hershbergeri biokatse on kavandatud osana *in vitro* ja *in vivo* katsetest, millega tehakse kindlaks endokriinsüsteemi mõjutada võivaid kemikaale, et hinnata ohtusid inimese tervisele ja keskkonnale.

4. Kuna loomade kastreerimise operatsioon on küsitav loomade heaolu seisukohast, püüti alternatiivse mudelina hakata kasutama opereerimata (kastreerimata) võõrutamiseas isasrotte, et vältida Hershbergeri biokatses kastreerimisetappi. Võõrutuseas isasloomade katsemeetod valideeriti (24); kuid valideerimisuuringus selgus, et Hershbergeri biokatse võõrutamiseas isasloomade versiooniga ei ole võimalik järjekindlalt avastada nõrkade antiandrogeenide kasutatud kontsentratsioonide mõju androgeenisõltuvate kudede massile. Seetõttu ei hõlma käesolev katsemeetod seda versiooni. Kuna aga selle kasutamine võib olla oluline mitte ainult loomade heaolu seisukohast, vaid võib anda ka teavet muude toimeviiside kohta, on see kättesaadav OECD juhenddokumendis 115 (25).

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

5. Androgeeni agonistid ja antagonistid toimivad androgeeniretseptorite ligandidena ja võivad vastavalt aktiveerida või pidurdada retseptorite poolt kontrollitavat transkriptsiooni. Lisaks takistavad mõned kemikaalid testosterooni muutmist mõjusamaks looduslikuks androgeeniks dihüdrotestosterooniks mõnes androgeeni sihtkoes (5α-reduktaasi inhibiitorid). Sellised kemikaalid võivad põhjustada tervisekahjustusi, sealhulgas reproduktiivfunktsiooni ja arengu häireid. Seepärast on regulatiivsetel eesmärkidel vaja kiiresti hinnata kemikaale kui võimalikke androgeeni agoniste või antagoniste või 5α-reduktaasi inhibiitoreid. Kuigi ligandi afiinsus androgeeniretseptori suhtes, mida mõõdetakse retseptorile sidumise või reportergeenide transkriptsiooni aktiveerimise kaudu *in vitro*, annab küll olulist teavet, ei ole see siiski mitte ainus võimalik ohtu põhjustav tegur. Muud tegurid hõlmavad metabolismi aktiveerimist ja inaktiveerimist pärast kehasse sisenemist, kemikaalide jaotumist sihtkudedesse ja väljutamist kehast. Seepärast on vaja kontrollida kemikaali võimalikku mõju *in vivo* asjakohastes tingimustes ja asjakohase kokkupuute korral. *In vivo* hindamine on vähem oluline, kui kemikaali sellised omadused, mis on seotud neeldumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamisega, on teada. Androgeenisõltuvad koed reageerivad androgeeniga stimuleerimisele kiire ja jõulise kasvuga, eriti enne puberteeti kastreeritud isasrottide puhul. Närilisi, eriti rotte, kasutatakse laialdaselt ka mürgisuse uuringutes ohu iseloomustamiseks. Seepärast sobib biokatse käesolev versioon, milles kasutatakse enne puberteeti kastreeritud rotte ja viit sihtkude, androgeeni agonistide, antagonistide või 5α-reduktaasi inhibiitorite *in vivo* sõelkatseks.

6. Käesolev katsemeetod põhineb OECD valideerimisuuringus kasutatud katse-eeskirjadel, mis osutusid usaldusväärseks ja korratavaks nii laborisisestes kui ka laboritevahelistes uuringutes (4, 5, 6, 7, 8). Käesolevas katsemeetodis on esitatud nii androgeeni kui ka antiandrogeeni määramise meetod.

7. Kuigi testosteroonpropionaadi (TP) doos, mida kasutati antiandrogeenide määramiseks OECD Hershbergeri biokatse valideerimisprogrammis, oli eri laborites erinev (0,2 ja 0,4 mg/kg/päevas, nahaalune süst), ei olnud nende kahe katse-eeskirja versioonide vahel suuri erinevusi nõrga või tugeva antiandrogeense aktiivsuse tuvastamises. Siiski on selge, et TP doos ei tohiks olla liiga kõrge, et takistada nõrkade androgeeniretseptori (AR) antagonistide mõju, ega liiga madal, nii et androgeenitundlike kudede kasv on liiga väike isegi ilma antiandrogeeni samaaegse manustamiseta.

▼**M5**

8. Üksikute androgeenitundlike kudede reaktsioon ei ole siiski täielikult tingitud androgeenist, st ka muud kemikaalid kui androgeeni antagonistid võivad muuta teatavate kudede massi. Mitme koe samaaegne kasv siiski tõendab androgeenispetsiifilist mehhanismi. Näiteks tugevad östrogeenid suures doosis võivad suurendada seemnepõiekeste massi; muud androgeenisõltuvad koed ei reageeri aga sarnasel viisil. Antiandrogeense toimega kemikaalid võivad toimida kas androgeeniretseptori antagonistidena või 5α-reduktaasi inhibiitoritena. 5α-reduktaasi inhibiitorid on mitmesuguse mõjuga, kuna muundamine tugevama toimega dihüdrotestosterooniks on eri kudedes erinev. Antiandrogeenidel, nagu finasteriid, mis inhibeerivad 5α-reduktaasi, on suurem mõju ventraalses eesnäärmes kui muudes kudedes, kui võrrelda sellise androgeeniretseptori tugeva antagonistiga nagu flutamiid. Seda erinevust kudede reaktsioonis võib kasutada androgeeniretseptorist sõltuva ja 5α-reduktaasist sõltuva toime eristamiseks. Lisaks sellele on androgeeniretseptor evolutsiooniliselt suguluses muude steroidhormoonide retseptoritega, ja kui mõnda muud hormooni manustatakse suures, füsioloogilist taset kaugelt ületavas doosis, võib see siduda end retseptoriga ja toimida testosteroonpropionaadi põhjustatava kasvu stimuleerimise antagonistina (13). Lisaks on ka usutav, et tõhustatud steroidide metabolism ja sellest tingitud seerumi testosteroonisisalduse vähenemine võib vähendada androgeenisõltuvate kudede kasvu. Seepärast tuleb Hershbergeri biokatse positiivse tulemuse hindamisel tavaliselt lähtuda sellest, kui kaalukad on tõendid, sealhulgas *in vitro* katsed, nagu androgeeniretseptori ja östrogeeniretseptori sidumise katsed ja vastavad transkriptsiooni aktivatsiooni katsed või muud *in vivo* katsed, millega uuritakse sarnaseid androgeeni sihtkudesid, nagu isaslooma puberteedikatse, 15-päevane opereerimata täiskasvanud isaslooma katse või 28-päevane või 90-päevane korduvdoosi uuring.

9. Kogemused näitavad, et ksenobiootilisi androgeene esineb harvemini kui ksenobiootilisi antiandrogeene. Seepärast eeldatakse, et Hershbergeri biokatset kasutatakse kõige sagedamini antiandrogeenide leidmise sõelkatsena. Androgeenide tuvastamise katset võib sellele vaatamata siiski soovitada steroidsete või steroidisarnaste kemikaalide või selliste kemikaalide puhul, mille võimaliku androgeense mõju kohta on saadud viiteid meetoditega, mis on kontseptuaalse raamistiku (2. liide) 1. või 2. tasemel. Sarnaselt sellega võib (anti)androgeense profiiliga seotud kahjulikke mõjusid leida 5. taseme uuringutega, mistõttu tuleb hinnata, kas kemikaal toimib endokriinse mehhanismi kaudu.

10. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomade hooldamise kohalikele normidele; järgmised loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (26), on nende suhtes ülimuslikud. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (17).

11. Nagu iga biokatse puhul, milles kasutatakse katseloomi, tuleb hoolikalt kaaluda, kas uuringut on üldse vaja teha. Sellise otsuse tegemiseks võib põhimõtteliselt olla kaks põhjust:

— suur oht kokkupuuteks (kontseptuaalne raamistik, 1. tase) või kaudsed andmed kemikaali (anti)androgeensuse kohta *in vitro* katsetest (2. tase), mille tõttu on vaja täiendavalt uurida, kas selline mõju võib esineda *in vivo*;

— (anti)androgeensusele osutav mõju 4. või 5. tasemel *in vivo* katsetes ja on vaja täiendavaid uuringuid konkreetse toimeviisi selgitamiseks, näiteks tõendamiseks, et mõju aluseks on (anti)androgeenne mehhanism.

▼M5

12. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

13. Hershbergeri biokatse on tundlik, kuna selles kasutatakse isasloomi, kelle endogeense androgeeni nõristumine on minimaalne. See saavutatakse kastreeritud isasloomade kasutamisega tingimusel, et pärast kastreerimist on möödunud piisavalt aega ning sihtkoed on taandarenenud miinimumini ja arvestatakse ühesugust nulljoonele vastavat massi. Seega on võimaliku androgeense toime avastamise sõeluuringu tegemisel veres ringleva endogeense androgeeni sisaldus madal, hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg ei suuda seda tagasisidemehhanismide kaudu kompenseerida, kudede võime androgeenile reageerida on viidud maksimumini ja lähtekoe mass miinimumini. Võimalike antiandrogeenide otsimisel võib saavutada kooskõlalisema kudede massi suurenemise, kui kudesid stimuleeritakse võrdlusandrogeeniga. Selle tulemusel on Hershbergeri biokatses vaja ainult 6 looma doosirühma kohta, samal ajal kui muudes katsetes opereerimata puberteedidealiste või täiskasvanud isasloomadega soovitatakse kasutada 15 isasloomа igas doosirühmas.

14. Isasrottide puberteedilähedane kastreerimine peaks toimuma asjakohasel viisil, heakskiidetud anesteetikumide ja aseptilise tehnika kasutamisega. Esimese paari päeva jooksul pärast operatsiooni tuleks manustada valuvaigisteid, et kõrvaldada operatsioonijärgseid vaevusi. Kastreerimine suurendab katsemeetodi täpsust nõrkade androgeenide ja antiandrogeenide avastamisel, kuna kõrvaldab kompenseerivad sisesekretsioonisüsteemi tagasisidemehhanismid, mis on olemas opereerimata katseloomas ja mis võivad nõrgendada manustatavate androgeenide ja antiandrogeenide mõju, ning kõrvaldab samuti eri isasrottide testosteroonitaseme suured erinevused seerumis. Seega vähendab kastreerimine loomade arvu, mida on vaja endokriinse mõju tuvastamiseks sõeluuringuga.

15. Sõeluuringuga võimaliku androgeense toime leidmiseks manustatakse uuritavat kemikaali iga päev suukaudse sondiga või nahaaluse süstiga kümnel järjestikusel päeval. Uuritavat kemikaali manustatakse vähemalt kahe doosirühma katseloomadele; kõigile ühe rühma loomadele manustatakse ühesuguseid doose. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Kahe või enama sihtorgani massi statistiliselt oluline suurenemine uuritavat kemikaali saanud rühmades võrreldes kontrollrühmaga, kellele antakse kandeainet, näitab, et uuritav aine on võimaliku androgeense toime suhtes positiivne (vt punkt 60). Sellised androgeenid nagu trenboloon, mida ei ole võimalik 5α — taandada, avaldab tugevamat mõju LABC-le (*levator ani-bulbocavernosus*) ja GP-le (*glans penis*) kui testosteroonpropionaat, kuid kõigi kudede juures peaks näha olema intensiivsemat kasvu.

16. Võimaliku antiandrogeense aktiivsuse otsimisel sõelkatsetega manustatakse uuritavat kemikaali iga päev suukaudse sondi või naha alla süstimisega kümnel järjestikusel päeval koos testosteroonpropionaadi igapäevase manustamisega (0,2 või 0,4 mg/kg/päevas) nahaluste süstide abil. Valideerimisprogrammiga tehti kindlaks, et võib kasutada kas 0,2 või 0,4 mg/kg/päevas, kuna mõlema doosiga sai avastada antiandrogeene ja sellepärast tuleks katses kasutamiseks valida ainult üks nendest doosidest. Erinevaid uuritava kemikaali doose manustatakse vähemalt kolme doosirühma katseloomadele; kõigile ühe rühma loomadele manustatakse ühesuguseid doose. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Kahe või enama sihtorgani massi statistiliselt oluline vähenemine uuritavat kemikaali ja testosteroonpropionaati saanud rühmades võrreldes kontrollrühmaga, kellele antakse ainult testosteroonpropionaati, näitab, et uuritav aine on võimaliku antiandrogeense toime suhtes positiivne (vt punkt 61).

▼M5

MEETODI KIRJELDUS

Liikide ja liinide valimine

17. Hershbergeri biokatseks on juba alates 1930. aastatest tavaliselt kasutatud rotte. Kuigi bioloogiliselt on võimalik, et roti ja hiire reaktsioon võib olla sarnane, on roti 70-aastase kasutamise põhjal kujunenud rott Hershbergeri biokatses eelistatud loomaliigiks. Lisaks sellele, kuna Hershbergeri biokatse tulemus võib olla pikema, mitut põlvkonda hõlmava uuringu eelkatse, võimaldab see kasutada mõlemas uuringus sama liigi ja liini ning samast allikast pärinevaid loomi.

18. Käesoleva katse-eeskirja kohaselt lubatakse laboril valida katses kasutamiseks sellise liini rott, keda osalevas laboris on varem tavaliselt kasutatud. Katseloomadena võib kasutada tavaliselt laboris peetavate rotiliinide loomi, kuid siiski ei tuleks kasutada liine, mille isasloomad küpsevad oluliselt hiljem kui 42 päeva vanuselt, kuna nende loomade kastreerimine 42. päeval võib takistada suguti pea massi määramist, mida saab teha alles pärast seda, kui eesnahk on eraldunud peenise tüve küljest. Seega ei tuleks kasutada liine, mis pärinevad Fisher 344 rottidest, või teha seda üksnes harvadel juhtudel. Fisher 344 rottidel on seksuaalse küpsemise ajastus teistsugune kui sagedamini kasutatavatel Sprague Dawley või Wistari liini rotid (16). Kui tuleb kasutada sellist liini, tuleks need kastreerida veidi kõrgemas vanuses ja labor peab suutma näidata, et kasutatav liin on tundlik. Labor peaks selgelt põhjendama, miks valiti konkreetse liini rotid. Kui sõeluuring võib olla korduva suukaudse doosi, reproduktiivtoksilisuse, arenguhäireid põhjustava toksilisuse või pikaajalise toksilisuse uuringu eelkatse, tuleks kõigis uuringutes eelistatavalt kasutada samast liinist ja samalt tarnijalt saadud loomi.

Pidamis- ja söötmistingimused

19. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kõikidele kohalikele normidele. Siin esitatud loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele ning rangemad kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (26), on nende suhtes ülimuslikud. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (ligikaudne vahemik ±3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt ei peaks olema üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Eesmärgiks peaks olema suhtelise õhuniiskuse hoidmine 50–60 % vahemikus. Valgustus peaks olema kunstlik. Ööpäevas peaks olema 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

20. Rühmas pidamine on eelistatav isoleerimisele, arvestades loomade noorust ja asjaolu, et rotid on seltsingulised loomad. Kahe või kolme looma paigutamine puuri võimaldab vältida liigset asustustihedust ja sellega seotud stressi, mis võib mõjutada paljunemisfunktsiooniga seotud kudede arengut. Puurid tuleb hoolikalt puhastada võimalikest saasteainetest; puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Sobiva suurusega puuris (ca. 2 000 ruutsentimeetrit) ei ole loomad liiga tihedalt.

21. Iga loom peab olema humaansel viisil eraldi märgistatud (nt kõrvamärk või lipik). Kasutatud märgistamismeetod tuleks kirjeldada.

▼M5

22. Laborisööda ja joogivee tarbimine peaks olema *ad libitum*. Hershbergeri biokatset tegev labor peaks kasutama tavalist sööta, mida tavaliselt kasutatakse kemikaalide katsetamise uuringute puhul. Biokatse valideerimisuuringus ei täheldatud mõju või varieeruvust, mille põhjuseks oleks tulnud pidada sööta. Kasutatud sööt tuleks kirjeldada ja laborisööda proov tuleks säilitada võimaliku tulevase analüüsi jaoks.

Androgeenisõltuvate organite masside kasutatavuse kriteeriumid

23. Valideerimisuuringu ajal ei saadud tõendeid, et kehamassi vähenemine oleks mõjutanud sihtkudede (st käesolevas uuringus kaalutavate kudede) massi suurenemist või vähenemist.

24. Valideerimisprogrammis edukalt kasutatud eri liinide hulgas on androgeenisõltuvate organite mass suurema kehamassiga rotiliinide puhul suurem kui väiksema kehamassiga rottidel. Hershbergeri biotesti kehtivuse kriteeriumid ei hõlma seega elundite oodatavat absoluutset massi positiivsetes (doosi)rühmades ja negatiivsetes kontrollrühmades.

25. Kuna koe puhul on variatsioonikordaja (CV) pöördvõrdeline statistilise võimsusega, siis Hershbergeri biokatse kasutatavuse kriteeriumid põhinevad iga koe puhul lubataval maksimaalsel CV väärtusel (tabel 1). CV väärtused tulenevad OECD valideerimisuuringutest. Negatiivse tulemuse korral peaks labor uurima kontrollrühma ja suure doosiga rühma CV-sid ja tegema kindlaks, kas kasutatavuse jaoks lubatava maksimaalse CV kriteerium on ületatud.

26. Uuringut tuleks korrata, kui: 1) kontrollrühma ja suure doosi rühmade kümnest võimalikust eraldi CV-st on kolm või enam suuremad agonisti ja antagonisti uuringute jaoks esitatud väärtustest tabelis 1 ning 2) vähemalt kaks sihtkude olid marginaalselt ebaolulised, st ρ väärtused on vahemikus 0,05–0,10. ([1])

Tabel 1

Maksimaalsed lubatavad CVd, mis on kastraatmudelis määratud paljunemisfunktsiooniga seotud sihtkudede jaoks OECD valideerimisuuringus ([1])

Kude	Antiandrogeensed mõjud	Androgeensed mõjud
Seemnepõiekesed	40 %	40 %
Ventraalne eesnääre	40 %	45 %
Levator ani-bulbocavernosus	20 %	30 %
Cowperi näärmed	35 %	55 %
Glans penis	17 %	22 %

([1]) CV künnisväärtus teatava koe jaoks määrati CV väärtuste graafikult, millele olid kantud kõikide valideerimisuuringute konkreetse mudeliga (agonist või antagonist) leitud keskväärtuste CV-d järjestatuna väikseimast suurimani. CV künnisväärtuseks loeti punkt, mille juures CV-väärtuste suurenemised järgmiste kõrgemate CV-de suunas muutusid järsult suuremaks kui mõne eelneva CV vahel — see loeti murdepunktiks. Tuleks märkida, et kuigi selle analüüsiga leiti suhteliselt usaldusväärsed murdepunktid katse antagonistide mudeli puhul, olid agonistide mudeli CV kõverad ühtlasemate suurenemistega väärtuste vahel, mistõttu künnisväärtuse CV leidmine selle meetodiga oli mõnevõrra meelevaldne.

▼M5

KATSE KORRALDUS

Õigusnormidele vastavus ja labori valideerimine

27. Erinevalt uterotroofsest katsest (käesoleva lisa peatükk B.54) ei ole Hershbergeri katse puhul enne katse alustamist vaja tõendada labori pädevust, kuna paralleelselt tehakse positiivset kontrollkatset (testosteroonpropionaat ja flutamiid) ja negatiivset kontrollkatset, mis on katse lahutamatud osad.

Loomade arv ja seisund

28. Igas doosi- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt 6 looma. See kehtib nii androgeense kui ka antiandrogeense katse-eeskirja kohta.

Kastreerimine

29. Pärast loomade saamist peaks olema esialgne kohanemisperiood mitu päeva, et veenduda, et loomad on hea tervise juures ja tunnevad end hästi. Kuna enne 42 päeva vanuseks saamist (PND 42) kastreeritud loomadel ei tarvitse eesnahk eralduda, tuleks loomad kastreerida 42. päeval või hiljem, mitte varem. Loomad kastreeritakse narkoosi all; munandikotti tehakse sisselõige, kõrvaldatakse mõlemad munandid ja munandimanused ning veresooned ja seemnejuhad ligeeritakse. Kui on kindlaks tehtud, et verejooksu ei ole, tuleks munandikott sulgeda õmbluse või klambritega. Loomadele tuleks esimestel päevadel pärast operatsiooni anda valuvaigistit, et leevendada operatsioonijärgseid ebamugavusi. Kui loomade tarnijalt ostetakse kastreeritud loomad, teatab tarnija loomade vanuse ja seksuaalse küpsuse staadiumi.

Kohanemine pärast kastreerimist

30. Loomadel tuleks lasta jätkata kohanemist laboritingimustega vähemalt 7 päeva pärast kastreerimist, et sihtkoed saaksid taandareneda (nende mass väheneb). Loomi tuleb iga päev jälgida ja kõik haiguse või kehaliste kõrvalekallete märkidega loomad tuleks kõrvaldada. Dooside manustamist uuringu tegemiseks saab alustada kõige varem seega 49. päeval pärast sündimist (PND 49), seda ei tohiks alustada hiljem kui päeval PND 60. Vanus lahkamise ajal ei tohiks olla suurem kui PND 70. Selline paindlikkus lubab laboril oma katseid tõhusalt planeerida.

Kehamass ja juhuvaliku alusel rühmadesse jagamine

31. Loomade kehamassi erinevused põhjustavad keha kudede massi varieeruvust nii rühma sees kui ka rühmade vahel. Suurem koemasside varieeruvus suurendab variatsioonikordajat (CV) ja vähendab katse statistilist võimsust (mida nimetatakse mõnikord katse tundlikkuseks). Seepärast tuleks kehamassi varieeruvust hoida nii eksperimentaalselt kui ka statistiliselt kontrolli all.

32. Eksperimentaalne kontrolli all hoidmine hõlmab kehamassi varieeruvuse võimalikult väiksena hoidmist nii katserühma piires kui ka rühmade vahel. Kõigepealt tuleks vältida ebatavaliselt väikseid või suuri loomi ja neid ei tuleks võtta uuritavate loomade hulka. Katse alguses ei tohiks loomade kehamassi varieeruvus olla suurem kui ±20 % keskmisest kehamassist (nt 175 g ± 35 g kastreeritud puberteedilähedases vanuses rottide puhul). Teiseks, loomad tuleks jaotada (kontroll- ja doosi)rühmadesse kehamassi varieeruvuse järgi juhuvaliku alusel, nii et iga rühma keskmine kehamass ei oleks statistiliselt erinev muu rühma vastavast näitajast. Kasutatud randomiseerimismeetodit tuleb kirjeldada.

▼M5

33. Kuna kemikaali mürgisus võib vähendada kehamassi doosirühmades, võrreldes kontrollrühmaga, võiks statistilise kaasmuutujana kasutada kehamassi uuritava kemikaali manustamise esimesel päeval, mitte kehamassi lahkamise ajal.

Dooside manustamine

34. Selleks et teha kindlaks, kas uuritaval kemikaalil võib *in vivo* olla androgeenset toimet, piisab tavaliselt kahest doosirühmast ning positiivsest kontrollrühmast ja kandeaine (negatiivsest) kontrollrühmast (vt punkt 43); seepärast eelistatakse sellist katse kava loomade heaoluga seotud põhjustel. Kui eesmärk on saada doosi ja toime vahelise sõltuvuse kõver või ekstrapoleerida toimet madalamatele doosidele, on vaja vähemalt 3 doosirühma. Kui on vaja ka muud teavet peale androgeense toime kindlakstegemise (näiteks hinnata mõju tugevust), tuleks kaaluda teistsugust dooside manustamise režiimi. Antiandrogeense toime uurimiseks manustatakse uuritavat kemikaali koos võrdluseks kasutatava androgeeniagonistiga. Tuleks kasutada vähemalt kolme uuritava kemikaali erineva doosiga katserühma (doosirühmad) ning positiivse kontrolli ja negatiivse kontrolli rühma (vt punkt 44). Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui doosirühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleb kontrollrühmale manustada kandeainet suurimas doosirühmade puhul kasutatud mahus.

35. Kõikide doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellega seotud materjalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Suurima doosi puhul tuleb kõigepealt arvesse võtta LD_{50} väärtust ja/või teavet ägeda mürgisuse kohta, et vältida loomade surma, suuri kannatusi või ebamugavusi (17, 18, 19, 20), ja teiseks olemasolevat teavet dooside kohta, mida on kasutatud subkroonilise ja kroonilise toksilisuse uuringutes. Üldiselt ei tohiks suurim doos põhjustada kehamassi vähenemist katse lõpuks mitte rohkem kui 10 % kontrollrühma loomade massist. Suurim doos peaks olema kas: 1) suurim doos, mis tagab loomade ellujäämise ja mis ei põhjusta erilist mürgistust või kannatusi loomadele pärast manustamist 10 järjestikusel päeval doosis kuni 1 000 mg/kg/päevas (vt punkt 36) või 2) doos, mis põhjustab (anti)androgeenset toimet, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kuna see on sõelkatse, siis võib kasutada suuri dooside intervalle (näiteks 0,5 logaritmilist ühikut, mis vastab dooside 3,2-kordsele erinevusele, või isegi 1 logaritmiline ühik). Kui vajalikke andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside leidmise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse (vt punkt 37).

Piirdoosi tase

36. Kui katse piirdoosiga 1 000 mg/kg/päevas ja väiksema doosiga vastavalt käesolevas eeskirjas kirjeldatud korrale ei tekita statistiliselt olulist muutust reproduktiivorganite massis, võib täiendavaid doositasemeid pidada mittevajalikuks. Sellist piirdoosi väärtust kasutatakse alati, välja arvatud sellised juhud, kui inimese kokkupuute andmed viitavad vajadusele kasutada kõrgemat doositaset.

Vahemiku leidmise kaalutlused

37. Vajaduse korral võib väikse arvu loomadega teha esialgse uuringu doosivahemiku leidmiseks, et valida sobivad doosirühmad (kasutades ägeda mürgisuse tuvastamise katseid (käesoleva lisa peatükid B.1b, B.1c (27), OECD katse-eeskiri 425 (19))). Hershbergeri biokatse puhul on eesmärk valida doosid, mis tagaksid loomade ellujäämise, ei oleks oluliselt mürgised ega põhjustaks loomadele erilist stressi pärast uuritava kemikaali manustamist kümnel järjestikusel päeval piirdoosiga kuni 1 000 mg/kg/päevas, nagu

▼M5

on märgitud punktides 35 ja 36. Selleks võib kasutada OECD juhenddokumenti (17), milles on määratletud mürgistusele või looma stressile osutavad kliinilised tunnused. Kui see on doosivahemiku leidmise uuringus teostatav, võib koed pärast 10-päevast kemikaali manustamist välja lõigata ja kaaluda ligikaudu 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Neid andmeid võib seejärel kasutada põhiuurimuses kasutatavate dooside valimise hõlbustamiseks.

Võrdluskemikaalid ja kandeaine

38. Võrdluseks kasutatav androgeeniagonist peaks olema testosteroonpropionaat (TP), CASi nr 57-82-5. Võrdlus-TP doos võib olla kas 0,2 või 0,4 mg/kg/päevas. Võrdluseks kasutatav androgeeniantagonist peaks olema flutamiid (FT), CASi nr 1311-84-7. Võrdlus-FT doos peaks olema 3 mg/kg/päevas ja FT tuleks manustada koos võrdlus-TP doosiga.

39. Soovitatav on võimaluse korral kõigepealt kaaluda manustamist vesilahusena või suspensioonina vees. Kuid kuna paljud androgeensed ligandid või nende metaboolsed eellased on hüdrofoobsed, kasutatakse kõige sagedamini lahust või suspensiooni õlis (nt maisi, maapähkli-, seesami- või oliiviõli). Uuritava kemikaali võib lahustada minimaalses koguses 95 % etanoolis või muus sobivas lahustis ja lahjendada lõpliku töökontsentratsioonini katses kasutatavas kandeaines. Lahusti toksilised omadused peaksid olema teada ning need tuleks välja selgitada eraldi kontrollrühmaga, kellele manustatakse üksnes lahustit. Kui uuritavat kemikaali peetakse stabiilseks, võib selle lahustamise hõlbustamiseks kasutada ettevaatlikku soojendamist ja tugevat segamist. Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kui uuritav kemikaal on stabiilne kogu uuringu jooksul, võib valmistada uuritava kemikaali lähtealikvoodi ja teha sellest iga päev vajalikud lahjendused, olles hoolikas, et vältida proovide saastumist või rikkumist.

Dooside manustamine

40. TP-d tuleks manustada nahaaluse süstiga ja FT-d suukaudse sondiga.

41. Uuritavat kemikaali manustatakse suukaudse sondiga või naha alla tehtava süstiga. Manustamistee valimisel tuleb arvestada loomade heaoluga seotud kaalutlusi ning uuritava kemikaali füüsikalisi ja keemilisi omadusi. Lisaks tuleb arvestada toksikoloogilisi aspekte, nagu kokkupuuteviisi asjakohasus inimese kemikaaliga kokkupuute seisukohast (nt suukaudne sond vastab allaneelamisele, nahaalused süstid — sissehingamisele või imendumisele naha kaudu), ning olemasolevaid toksikoloogilist teavet ja andmeid metabolismi ja kineetika kohta (nt vajadus vältida presüsteemset metabolismi, suurem tõhusus teatava manustamistee korral), enne kui süstimise teel saadud positiivse tulemuse põhjal algatatakse ulatuslik pikaajaline uuring.

42. Loomadele tuleks doose manustada samal viisil ja sama ajakava kohaselt 10 järjestikusel päeval umbes 24-tunniste vaheaegadega. Doosi suurust tuleks kohandada iga päev, arvestades igapäevaseid kehamassi määramise andmeid. Igal doosi manustamise päeval tuleks kirja panna doosi maht ja manustamise kellaaeg. Tuleb jälgida, et ei ületataks maksimaalset doosi, mida on kirjeldatud punktis 35, et andmeid oleks võimalik mõistlikult tõlgendada. Selles suhtes tuleks hoolikalt hinnata kehamassi vähenemist, kliinilisi tunnuseid ja muid tähelepanekuid. Tuleks kasutada suukaudset sondi, maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Vedeliku suurim kogus,

▼M5

mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Tuleb järgida kohalikke loomakaitse eeskirju, kuid lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, kus võib kasutada mahtu kuni 10 ml kehamassi kg kohta. Nahaaluse süstiga manustamisel tuleks doose manustada selja abaluu- või nimmepiirkonda steriilse nõelaga (kaliiber näiteks 23 või 25) ja tuberkuliinisüstlaga. Soovi korral võib süstimiskoha puhtaks raseerida. Registreerida tuleks lahuse kaod, süstekohast väljaimbumine või doosi mittetäielik manustamine. Päevas rotile süstitav vedelikukogus ei tohiks ületada 0,5 ml kehamassi kg kohta.

Androgeeniagonistide katsete tegemise meetodid

43. Androgeeniagonistide katsetes on kandeaine negatiivne kontroll ja TP-d saav rühm on positiivse kontrolli rühm. Androgeeniagonistile omast bioloogilist toimet kontrollitakse uuritava kemikaali manustamisega katserühmadele valitud doosis 10 järjestikuse päeva jooksul. Kemikaali saanud katserühma loomade paljunemisfunktsiooniga seotud viie koe massi võrreldakse kandainet saanud loomade vastavate kudede massiga, et leida statistiliselt oluline massi suurenemine.

Androgeeniantagonistide ja 5α-reduktaasi inhibiitorite katsete tegemise meetodid

44. Androgeeniantagonistide ja 5α-reduktaasi inhibiitorite katsetes on TP-d saav rühm negatiivne kontroll ja rühm, mille loomadele manustatakse korraga TP-d ja FT-d, on positiivne kontroll. Androgeeniantagonistide ja 5α-reduktaasi inhibiitoritega seotud bioloogilist toimet kontrollitakse TP võrdlusdoosi ja uuritava kemikaali manustamisega 10 järjestikuse päeva jooksul. TP-d ja kemikaali saanud katserühma loomade paljunemisfunktsiooniga seotud viie koe massi võrreldakse ainult TP-d saanud loomade vastavate kudede massiga, et leida statistiliselt oluline massi vähenemine.

VAATLUSED

Kliinilised vaatlused

45. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas ja sagedamini, kui ilmneb toksilisuse märke. Vaatlusi oleks soovitatav teha iga päev samal ajal, võttes arvesse oodatava maksimaalse mõju avaldumise aega pärast doosi manustamist. Kõigi loomade puhul tuleks jälgida suremust, haigestumust ja selliseid kliinilisi tunnuseid nagu käitumise, naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine).

46. Surnuna leitud loomad tuleks kõrvaldada ning hävitada ilma täiendava andmete analüüsita. Iga looma surm enne lahangut tuleks kanda katseprotokolli koos surma võimalike põhjustega. Kõik suremas olevad loomad tuleks humaanselt surmata. Iga suremas olnud ja hiljem eutanaasia teel surmatud loom tuleks kanda katseprotokolli ja esitada haiguse võimalikud põhjused.

▼M5

Kehamass ja sööda tarbimine

47. Kõiki loomi tuleks kaaluda iga päev täpsusega 0,1 g, alustades hetkest enne esimese doosi manustamist, st kui loomad on juba jagatud rühmadesse. Lisaks võib mõõta dooside manustamise aja jooksul igas puuris tarbitud sööda koguse söötmisseadmete kaalumisega. Sööda tarbimise tulemused väljendatakse grammides ühe roti kohta päevas.

Lahkamine ning kudede ja organite massi mõõtmine

48. Ligikaudu 24 tundi pärast uuritava kemikaali viimase doosi manustamist tuleks rotid humaanselt surmata ja lasta verest tühjaks joosta vastavalt katset tegeva labori tavalisele korrale ning teha lahkamine. Humaanse surmamise meetod tuleks esitada katseprotokollis.

49. Ideaaljuhul tuleks kõikide rühmade liikmete lahkamised teha juhuslikus järjekorras, et vältida kõige alguses või kõige lõpus ühe või teise rühma liikmete lahkamist, mis võiks andmeid mõjutada. Kõik lahkamise tähelepanekud, nagu patoloogilised muutused või nähtavad kahjustused, tuleks üles märkida ja esitada protokollis.

50. Viis androgeenisõltuvat kude (VP, SV, LABC, COW, GP) tuleks kaaluda. Need koed tuleks välja lõigata, hoolikalt vabastada liigsetest nende külge kinnitunud kudedest ja rasvast ning määrata nende värske (fikseerimata) mass. Iga kude tuleks käidelda eriti hoolikalt, et vältida vedelike kaotust ja kuivamist, mis võib põhjustada suuri vigu ja varieeruvust, kuna väheneb registreeritav mass. Mitmed koed võivad olla väga väiksed või raskesti välja lõigatavad ja see tekitab varieeruvust. Seepärast on oluline, et paljunemisfunktsiooniga seotud kudede eraldamist sooritav isik tunneks nende kudede eraldamise tavalist korda. Standardse töökorra (SOP) käsiraamatu saab OECD-lt (21). Uuringu tulemuste võimalikku varieeruvust saab vähendada SOP juhendialase hoolika koolitusega. Ideaaljuhul peaks teatava konkreetse koe eraldamisi tegema sama isik, et vähendada isikutevahelisi erinevusi kudede töötlemisel. Kui see ei ole võimalik, peaks lahkamine olema korraldatud nii, et iga lahkaja eraldab teatavat kude kõigi katserühmade loomadelt, mitte nii, et üks isik eraldab kõik koed kontrollrühma loomadelt ja teine isik doosirühmade loomadelt. Iga paljunemisfunktsiooniga kude tuleks ilma kuivaks pühkimata kaaluda 0,1 mg täpsusega ja iga looma kudede massid tuleb registreerida.

51. Mitmed koed võivad olla väga väiksed või raskesti välja lõigatavad ja see tekitab varieeruvust. Varasema tööga on leitud variatsioonikordajate (CV) vahemik, mis näib olevat erinev ja näib sõltuvat labori pädevuse tasemest. Mõnel juhul on täheldatud kudede, nagu VP ja COW, absoluutmasside suuri erinevusi samas konkreetses laboris.

52. Soovi korral võib määrata ka maksa massi, mõlema neeru massi (koos) ja mõlemate neerupealiste massi (koos). Koed tuleks ka sel puhul vabastada nendega ühendatud sidekirmetest ja rasvast. Maks tuleks kaaluda täpsusega 0,1 g, mõlemad neerud ja mõlemad neerupealised — täpsusega 0,1 mg ning need andmed registreerida. Maksa, neerusid ja neerupealisi ei mõjuta mitte üksnes androgeenid; need elundid annavad kasulikku teavet ka süsteemse mürgisuse kohta.

▼**M5**

53. Soovi korral võib mõõta luteiniseeriva hormooni (LH), folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja testosterooni (T) sisalduse seerumis. Testosteroonisisaldust seerumis on kasulik määrata siis, kui uuritav kemikaal põhjustab testosterooni metabolismi maksas ja vähendab seerumi testosteroonisisaldust. Kui selliseid T andmeid ei ole, võib näida, et mõju avaldub antiandrogeense mehhanismi kaudu. LH tase annab teavet antiandrogeeni omaduse kohta mitte ainult vähendada elundite massi, vaid mõjutada ka hüpotalamuse-ajuripatsi funktsioone, mis pikaajalises katses võib tekitada munandikasvajaid. FSH on oluline hormoon spermatogeneesi jaoks. Võib määrata ka seerumi T4 ja T3 sisalduse; see võib anda kasulikku lisateavet kemikaali võime kohta häirida kilpnäärme homöostaasi. Kui tehakse hormoonide mõõtmisi, tuleks rotid enne lahkamist tuimastada ja võtta neilt veri südame punktsiooniga; narkoosimeetod tuleks valida hoolikalt, et mitte mõjutada hormoonitaseme mõõtmisi. Seerumi valmistamise meetod, radioimmuunanalüüsi- või muude mõõtmiskomplektide päritolu ja tulemused tuleks registreerida. LH ja T sisaldus esitatakse ng-des seerumi ml kohta.

54. Kudede eraldamisel tuleb tugineda üksikasjalikele fotodega lahkamisjuhenditele, mis on avaldatud valideerimisprogrammi osana kui lisamaterjal (21). Korea toidu- ja ravimiameti veebisaidil on kättesaadav ka lahkamist käsitlev video (22).

— Looma keha pannakse lauale kõhuga ülespoole ja tehakse kindlaks, kas suguti eesnahk on eraldunud suguti peast. Kui see on nii, tõmmatakse eesnahk tagasi, eemaldatakse suguti pea ja kaalutakse see 0,1 mg täpsusega; mass registreeritakse.

— Avatakse kõhunahk ja kõhuõõne sein, paljastatakse siseelundid. Kui tuleb määrata soovi korral määratavate elundite mass, eemaldatakse ja kaalutakse maks täpsusega 0,1 g, eemaldatakse magu ja soolestik, eemaldatakse ja kaalutakse neerud (koos) ja neerupealised (koos) täpsusega 0,1 mg. Sellise lahkamisega paljastatakse kusepõis ja jõutakse isaslooma paljunemisfunktsiooniga seotud kudede eraldamiseni.

— Ventraalse eesnäärme eraldamiseks eraldatakse kusepõis kõhulihaste kihist, milleks lõigatakse läbi sidekude piki keskjoont. Kusepõis nihutatakse ettepoole seemnepõiekeste suunas, millega paljastatakse ventraalse eesnäärme (*ventral prostate*, VP) vasak ja parem sagar (mida katab rasvakiht). Rasv pühitakse ettevaatlikult VP vasakult ja paremalt sagaralt. VP parem sagar tõstetakse kusitilt ja eraldatakse sagar kusitist. Hoides VP paremat sagarat, tõstetakse VP vasak sagar kusitilt ja eraldatakse; kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja registreeritakse mass.

— Seemnepõiekeste ja koagulatsiooninäärmete (*seminal vesicles plus coagulating glands*, SVCG) eraldamiseks lükatakse põis saba poole, millega paljastatakse seemnejuhad ning SVCG parem ja vasak sagar. Vedeliku lekke ärahoidmiseks pannakse verejooksu sulgemise klamber SVCG lähtekohale, kus seemnejuha ühineb kusitiga. SVCGd eraldatakse ettevaatlikult, hoides klambrit oma kohal, lõigatakse ära rasv ja manused, pannakse teadaoleva massiga kaalumisnõusse, eemaldatakse klamber, kaalutakse 0,1 mg täpsusega ja registreeritakse mass.

▼M5

— Selleks et eraldada *levator ani* ja *bulbocavernosus* (LABC) lihased, paljastatakse suguti alus ja lihased. LA lihased ümbritsevad käärsoolt, samal ajal kui eesmised LA ja BC lihased on kinnitunud suguti sibulale. Perianaalse piirkonna nahk ja manused, mis ulatuvad peenise lähtekohast kuni päraku eesmise otsani, eemaldatakse. BC lihased eraldatakse järk-järgult suguti sibulast ja kudedest. Käärsool lõigatakse pooleks ja nüüd saab eraldada ja kõrvaldada kogu LABC. LABC tuleks puhastada rasvast ja manustest, kaaluda 0,1 mg täpsusega ja registreerida mass.

— Kui LABC on eemaldatud, tulevad nähtavale ümmargused Cowperi või bulbouretraalnäärmed (COW) suguti sibula lähtekoha juures, veidi selja poole. Lõigata tuleb hoolikalt, et vältida õhukese kesta läbitorkamist ja vedeliku väljavoolu. COW (koos) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja registreeritakse mass.

— Lisaks, kui lahkamise või kudede eraldamise ajal voolas mõnest näärmest vedelikku välja, tuleks see registreerida.

55. Kui ühe kemikaali hindamiseks on vaja lahata rohkem loomi, kui ühe päevaga on võimalik lahata, võib uuringu alguse jaotada kahele järjestikusele päevale, millega ka lahkamine ja sellega seotud tööd jaotuvad kahele päevale. Kui töö jaotatakse niimoodi järkudesse, tuleks ühel päeval kasutada pooled iga doosirühma loomadest.

56. Kehad tuleks pärast lahangut kõrvaldada sobival viisil.

PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

57. Andmed tuleks esitada eraldi iga looma kohta (kehamass, paljunemisfunktsiooniga seotud kudede mass, soovi korral tehtud täiendavad mõõtmised, muud toimed ja tähelepanekud) ja iga loomarühma kohta (arvutatakse kõikide mõõtmistulemuste keskväärtused ja standardhälbed). Andmed tuleb koondada tabelisse. Tuleks esitada loomade arv katse alguses, katse käigus surnult või mürgistuse tunnustega leitud loomade arv, täheldatud toksilisuse tunnuste kirjeldus, sealhulgas tunnuste ilmumise aeg, tunnuste kestus ja raskus.

58. Lõpp-protokollis tuleks esitada järgmine.

Uurimislabor:

— nimi ja asukoht;

— uuringu juht, muud töötajad ja nende kohustused uuringu käigus;

— uuringu alguse ja lõpetamise kuupäev, st uuritava kemikaali manustamise esimene päev ja viimane lahkamispäev.

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, nimetus, puhtus, tarnija täielik aadress ja uuritava kemikaali täielik iseloomustus;

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— lahjenduste valmistamise meetod, sagedus ja lahuste hoiutingimused;

— kõik andmed, mis on saadud püsivuse kohta;

— kõik manustamislahuste või -suspensioonide analüüsid.

▼**M5**

Kandeaine:

— kandeaine iseloomustus (nimetus, tarnija ja partii nr);

— kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad ja nende pidamise tingimused:

— kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;

— päritolu või tarnija, kaasa arvatud täielik aadress;

— tarnitud loomade arv ja vanus;

— pidamistingimused (temperatuur, valgustus jne);

— sööt (nimetus, tüüp, tarnija, partii number, koostis ja, kui on teada, fütoöstrogeenide sisaldus);

— allapanu (nimetus, tüüp, tarnija ja koostis);

— puuridesse paigutamise tingimused ja loomade arv puuris.

Katse tingimused:

— vanus kastreerimise ajal ja kohanemise kestus pärast kastreerimist;

— iga looma mass katse alguses (täpsusega 0,1 g);

— kasutatud randomiseerimismeetod ning kandeaine rühma, võrdlusrühma, uuritava kemikaali rühmadesse ja puuridesse määramise andmed;

— iga rühma loomade kehamassi keskväärtus ja standardhälve igal kaalumispäeval kogu uuringu kestel;

— doosi valimise põhjendused;

— uuritava kemikaali manustamise tee ja kokkupuuteviisi valiku põhjendus;

— antiandrogeensuse katse tegemisel TP manustamine (doos ja maht);

— uuritava kemikaali manustamine (doos ja maht),

— manustamise aeg;

— lahkamise kord, sealhulgas veretustamise vahendid ja kasutatud anesteetikumid;

— seerumianalüüside tegemise korral tuleks esitada meetodi üksikasjad. Näiteks, kui kasutatakse radioimmuunananalüüsi (RIA), tuleks esitada järgmine: RIA tegemise kord, RIA komplektide tootja, RIA komplektide aegumise kuupäev, sädearvestuse kord ja standardimine.

Tulemused

— Igapäevased tähelepanekud iga looma kohta dooside manustamise ajal, sealhulgas:

— kehamass (täpsusega 0,1 g);

— kliinilised tunnused (kui neid esineb);

— kõik andmed ja tähelepanekud sööda tarbimise kohta.

— Lahkamise ajal tehtud tähelepanekud iga looma kohta, sealhulgas:

▼M5

— lahkamise kuupäev;

— doosirühm;

— looma identifitseerimisnumber;

— lahkaja;

— lahangu ja kudede eraldamise kellaaeg;

— looma vanus;

— lõplik kehamass lahkamise ajal; märkida iga statistiliselt oluline suurenemine või vähenemine;

— loomade veretustamise ja lahkamise järjekord;

— viie androgeenisõltuva sihtkoe mass;

— ventraalne eesnääre (täpsusega 0,1 mg);

— seemnepõiekesed ja koagulatsiooninäärmed, koos vedelikuga (koos, täpsusega 0,1 mg);

— *levator ani* ja *bulbocavernosus* lihaste kompleks (täpsusega 0,1 mg);

— Cowperi näärmed (märgkaal, koos, täpsusega 0,1 mg);

— peenise pea (märgkaal täpsusega 0,1 mg);

— soovi korral määratavate kudede kaal, kui määrati:

— maks (täpsusega 0,1 g);

— neerud (koos, täpsusega 0,1 mg);

— neerupealised (koos, täpsusega 0,1 mg);

— Üldised märkused ja kommentaarid

— Seerumihormoonide analüüsid, kui need tehti:

  — seerumi luteiniseeriv hormoon (soovi korral; nanogrammi seerumi ml-s) ja

  — seerumi testosteroon (soovi korral; nanogrammi seerumi ml-s).

— Üldised märkused ja kommentaarid

Andmete kokkuvõte

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, milles näidatakse valimi suurus iga rühma puhul, keskväärtus ja selle standardviga või standardhälve. Tabelites tuleks esitada surmajärgne kehamass, kehamassi muutus dooside manustamise algusest kuni lahkamiseni, paljunemisfunktsiooniga seotud kudede mass ja soovi korral määratud muude elundite mass.

Tulemuste arutelu

Tulemuste analüüs

59. Lahkamise ajal määratud kehamassi ja organite massi tuleks statistiliselt analüüsida ja leida näitajad nagu dispersiooni homogeensus, mille jaoks on andmeid vaja sobivalt teisendada. Doosirühmi tuleks võrrelda kontrollrühmaga, kasutades selliseid meetodeid nagu ANOVA, millele järgnevad paariviisilised võrdlused (nt Dunnetti ühepoolne test) ja statistilise erinevuse kriteerium, näiteks $p \leq 0,05$. Tuleb kindlaks teha rühmad, milles on saavutatud statistiline olulisus. Elundite suhtelisi masse kehamassi suhtes tuleks siiski vältida, kuna selline andmetöötlus tugineb vääradele statistilistele eeldustele.

▼**M5**

60. Androgeeniagonismi puhul tuleks kontrollrühmale manustada ainult kandeainet. Uuritava kemikaali toimimisviisi omadused võivad põhjustada eri kudedel suhteliselt erinevat toimet; näiteks trenboloon, mida ei saa 5α-taandada, avaldab tugevamat mõju LABC-le ja GP-le kui TP. Statistiliselt olulist ($p \leq 0,05$) massi suurenemist viiest androgeenisõltuvast sihtkoest (VP, LABC, GP, CG ja SVCG) vähemalt kahe puhul tuleks lugeda androgeeniagonisti tuvastamise mõttes positiivseks tulemuseks ja kõigi sihtkudede puhul peaks olema näha vähemalt mingisugust kasvu. Kõikide isassuguorganite kudede reageerimise kombineeritud hindamiseks võib kasutada mitmest korrelatsioonanalüüsi. See võib tõsta analüüsi kvaliteeti, eelkõige juhtudel, kui ainult ühe koe reaktsioon on statistiliselt oluline.

61. Androgeeniantagonismi puhul tuleks kontrollrühmale manustada ainult võrdlusandrogeeni (ainult testosteroonpropionaati). Uuritava kemikaali toimimisviisi omadused võivad põhjustada eri kudede suhteliselt erinevat reageerimist; näiteks 5α-reduktaasi inhibiitorid, nagu finasteriid, mõjutavad tugevamini ventraalset eesnääret kui muid kudesid, võrreldes tugevate androgeeniretseptori antagonistidega nagu flutamiid. Statistiliselt olulist ($p \leq 0,05$) massi vähenemist viiest androgeenisõltuvast sihtkoest (VP, LABC, GP, CG ja SVCG) vähemalt kahe puhul, võrreldes ainuüksi TP-d saanud kontrollrühmaga, tuleks lugeda androgeeniantagonisti tuvastamise mõttes positiivseks tulemuseks ja kõigi sihtkudede puhul peaks olema näha vähemalt mingil määral vähenenud kasvu. Kõikide isassuguorganite kudede reageerimise kombineeritud hindamiseks võib kasutada mitmest korrelatsioonanalüüsi. See võib tõsta analüüsi kvaliteeti, eelkõige juhtudel, kui ainult ühe koe reaktsioon on statistiliselt oluline.

62. Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina: keskväärtus, keskväärtuse standardviga (sobib ka standardhälve) ja iga rühma valimi suurus. Samuti tuleks lisada üksikandmete tabelid. Tuleks uurida kontrollrühma konkreetseid väärtusi, keskväärtust, keskväärtuse viga (standardhälvet) ja variatsioonikoefitsienti (CV), et teha kindlaks, kas need vastavad varasemate väärtustega kooskõla kriteeriumidele. CV väärtused, mis ületavad tabelis 1 (vt punktid 25 ja 26) esitatud CV väärtusi iga organi massi puhul, peaksid näitama, kas andmete lugemisel või registreerimisel on tehtud vigu või kas labor ei ole veel saavutanud androgeenisõltuvate kudede väljalõikamiseks vajalikku meisterlikkust ja vaja oleks täiendavat koolitust või harjutamist. Üldiselt on CV-d (saadakse standardhälbe jagamisel organi massi keskväärtusega) eri laborite ja eri uuringute tulemuste võrdlemisel korratavad. Esitatud andmed peaksid hõlmama vähemalt järgmist: ventraalse eesnäärme, seemnepõiekeste, *levator ani* ja *bulbocavernosus* lihaste, Cowperi näärmete, suguti pea, maksa ja keha mass ning kehamassi muutus dooside manustamise algusest kuni lahkamiseni. Võib esitada ka parandatud andmed, millesse on kovariatsiooni abil tehtud kehamassi muutumist arvestavad parandid, kuid see ei tohiks asendada korrigeerimata andmete esitamist. Lisaks sellele, kui eesnaha eraldumist (*preputial separation*, PPS) mõnes rühmas ei esine, tuleks registreerida PPS ja võrrelda seda statistiliselt olukorraga kontrollrühmas, kasutades Fisheri täpset testi.

▼**M5**

63. Arvutisse sisestatud andmete kontrollimisel võrdluses originaalandmete lehtedega tuleb hoolikalt uurida organite kaalu väärtusi, mis ei ole bioloogiliselt usutavad või erinevad rohkem kui kolm standardhälvet vastava katserühma keskväärtusest; sellised andmed tuleb võib-olla välja jätta kui tõenäolised registreerimisvead.

64. Sageli on uuringu tulemuste võrdlemine OECD CV väärtustega (tabel 1) tõlgendamise oluline etapp, mis näitab uuringu tulemuste kehtivust. Laboris tuleks säilitada võrdlusrühmade kohta kogutud varasemaid andmeid. Samuti tuleks laboris säilitada andmed positiivsete võrdluskemikaalide nagu TP ja FT toime kohta. Laborid võivad perioodiliselt testida ka teadaolevalt nõrkade androgeeniagonistide ja -antagonistide toimet ning säilitada need andmed. Neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate OECD andmetega selle kontrollimiseks, et labori meetodid annavad piisava statistilise täpsuse ja võimsuse.

▼**M5**

1. liide

MÕISTED

Androgeenne – termin, millega kirjeldatakse positiivset mõju androgeenisõltuvate kudede kasvule.

Antiandrogeenne – kemikaali võime alla suruda testosteroonpropionaadi toimet imetajate organismile.

Doos – manustatav uuritava kemikaali kogus. Hershbergeri biokatse puhul väljendatakse doosi uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks mg kehamassi kg kohta päevas).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, dooside manustamise sagedust ja kestust.

Kemikaal – aine või segu.

Spetsiifilisus – katsemeetodi võime õigesti kindlaks määrata kemikaale, millel ei ole katsega kontrollitavat omadust.

Suremas olev – termin, millega kirjeldatakse surmaelses seisundis looma.

Sünnijärgne päev X – X. elupäev pärast sünnikuupäeva.

Sünnikuupäev – sünnijärgne päev 0 (PND 0).

Tundlikkus – katsemeetodi võime õigesti kindlaks määrata kemikaale, millel on katsega kontrollitav omadus.

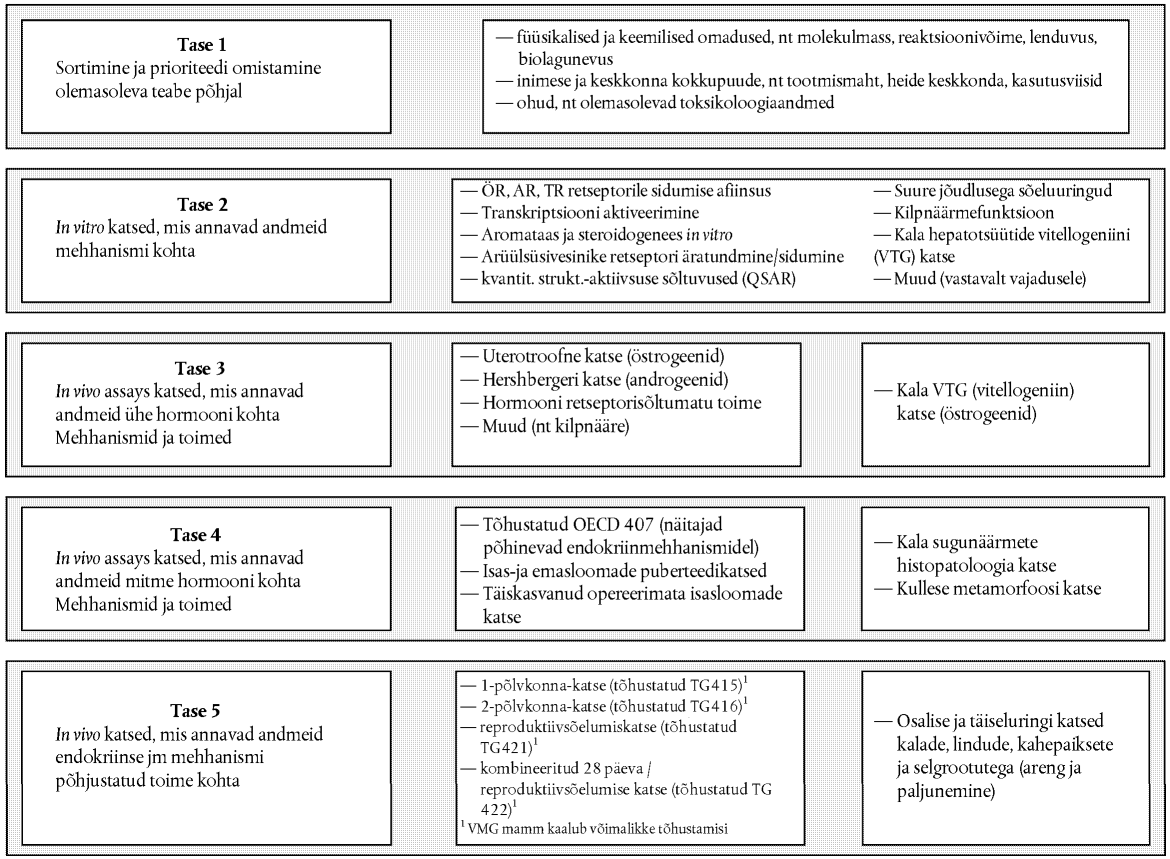
Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideerimine – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

2. liide

Märkus: dokumendi on koostanud juhenddokumentide programmi sekretariaat vastavalt kokkuleppele, mis saavutati EDTA töörühma 6. koosolekul

Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik



VMG mamm: imetajatega tehtavate katsete valideerimist ja hindamist juhtiv rühm

02008R0440 — ET — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

MÄRKUSED RAAMISTIKU JUURDE

Märkus 1: kõigile tasemetele on võimalik siseneda ja kõigilt tasemetelt on võimalik väljuda; see oleneb sellest, millist teavet on vaja saada ohtude ja riskide hindamiseks.

Märkus 2: tasemel 5 peaks ökotoksikoloogia hõlmama näitajaid, mis näitavad kahjuliku mõju mehhanisme ja võimalikku kahju elanikkonna jaoks.

Märkus 3: kui mitme näitaja kohta tulemusi andev katsemudel hõlmab näitajaid, mida määratakse ühe näitaja kohta tulemusi andva katsega, peaks nimetatud mudel asendama ühe näitaja kohta tulemusi andva katsed.

Märkus 4: iga kemikaali tuleks eraldi hinnata, võttes arvesse kogu olemasolevat teavet ja pidades silmas raamistiku tasemete funktsiooni.

Märkus 5: praegust raamistikku ei tuleks käsitleda kõike hõlmavana. Tasemetel 3, 4 ja 5 hõlmab raamistik katseid, mis on juba kättesaadavad või valideerimine on käimas. Viimast asjaolu arvestades on need ajutiselt lisatud. Kui need on välja töötatud ja valideeritud, saab need ametlikult lisada raamistikku.

Märkus 6: raamistikust ei tohiks niimoodi aru saada, et tasemel 5 on üksnes lõplikud katsed. Arvestatakse, et osutatud tasemel olevad katsed aitavad kaasa üldisele ohtude ja riskide hindamisele.

KIRJANDUS

1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. Vt: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5α-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

▼M5

8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671–8.

9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413–422.

10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306-1314.

11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38–44.

12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113–119.

13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175–180.

14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. Vt: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151–220.

16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.

17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92–64-12367-9, Paris.

19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.

23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

26) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

27) Käesoleva lisa järgmised peatükid:

B.1a. Äge suukaudne mürgisus — kindla annuse protseduur

B.1b. Äge suukaudne mürgisus — ägeda mürgisusastme meetod

▼M5

B.56. **LAIENDATUD ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTIIVTOKSILISUSE UURING**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 443 (2012). See põhineb Rahvusvahelise Bioteaduste Instituudi (Life Science Institute, ILSI), Tervise- ja Keskkonnateaduste Instituudi (Health and Environmental Sciences Institute, HESI), põllumajanduskemikaalide ohutuse hindamise (Agricultural Chemical Safety Assessment, ACSA) tehnilise komitee ettepanekul võtta aluseks elujärgu F_1 laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring, mille on avaldanud Cooper *et al*., 2006 (1). Uuringu eeskirja on täiustatud ja selgitatud,et tagada paindlikkust ja rõhutada, et oluline on alustada olemasolevatest teadmistest ja kasutada uuringu suunamiseks ja kohandamiseks elusloomadega tehtud tähelepanekuid. Käesolevas katsemeetodis on üksikasjalikult kirjeldatud laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu läbiviimist. Katsemeetodis kirjeldatakse kolme F_1-loomade kohorti:

kohort 1: hinnatakse paljunemist ja arengut iseloomustavaid näitajaid; seda kohorti võib laiendada, et hõlmata F_2-põlvkond;

kohort 2: hinnatakse kemikaaliga kokkupuute võimalikku mõju arenevale närvisüsteemile;

kohort 3: hinnatakse kemikaaliga kokkupuute võimalikku mõju arenevale immuunsüsteemile.

2. Otsused selle kohta, kas hinnata teist põlvkonda ja jätta ära arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse kohort ja/või arenguhäireid põhjustava immunotoksilisuse kohort, peaksid põhinema olemasolevatel teadmistel uuritava kemikaali kohta, samuti mitmesuguste reguleerivate asutuste vajadustel. Katsemeetodi eesmärk on anda üksikasjalist teavet selle kohta, kuidas uuringut võib teostada ja kuidas iga kohorti tuleks hinnata.

3. Otsustamise kord, millise sisekriteeriumi põhjal algatatakse 2. põlvkonna uuring, on kirjeldatud OECD suunisdokumendis 117 (39) reguleerivate asutuste jaoks, kes kasutavad sisekriteeriume.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu peamine eesmärk on hinnata konkreetseid eluetappe, mida ei hõlma muud tüüpi mürgisuse uuringud, ja uurida toimet, mis võib ilmneda kemikaaliga sünnieelse ja -järgse kokkupuute puhul. Paljunemisfunktsiooniga seotud näitajate uurimiseks on kavandatud, et esimese etapina tuleb võimaluse korral kasutada korduvdoosi uuringutest saadud teavet (sh reproduktiivtoksilisuse sõeluuringud, nagu OECD katsejuhend 422 (32)) või kiireid sisesekretsioonisüsteemi häirivate kemikaalide sõelkatseid (nt uterotroofne katse, katsemeetod B.54 (36), ja Hershbergeri katse, katsemeetod B.55 (37)), et teha kindlaks mõju isas- ja emasloomade reproduktiivorganitele. See võib hõlmata spermatogeneesi (munandite histopatoloogia) isasloomadel ning innatsükleid, folliikulite loendamist või munarakkude valmimist ja munasarjade kahjustusi (histopatoloogia) emasloomadel. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring võimaldab leida paljunemisega seotud näitajaid, mille määramiseks on vaja isasloomade suhtlemist emasloomadega, emasloomade vastastikust toimet areneva lootega ning emasloomade suhtlemist järglaste ja F_1-põlvkonnaga kuni ajani pärast seksuaalse küpsuse saabumist (vt käesolevat katsemeetodit toetav OECD juhenddokument nr 151 (40)).

▼**M5**

5. Katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata kemikaaliga sünnieelse ja -järgse kokkupuute mõju arengule, samuti selleks, et põhjalikult hinnata süsteemset toksilisust tiinete ja imetavate emasloomade, noorte ja täiskasvanud järglaste puhul. Katsega tahetakse üksikasjalikult uurida peamisi arenguga seotud näitajaid, nagu järglaste eluvõime, vastsündinute tervise-seisund, sünniaegsed arengunäitajad ning füüsiline ja funktsionaalne areng kuni täisikka jõudmiseni, et teha kindlaks konkreetsed sihtelundid järglaste puhul. Lisaks annab uuring teavet uuritava kemikaali mõju kohta täiskasvanud isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemi kahjustuste ja toimimise kohta või kinnitab sellist teavet. Muu hulgas vaadeldakse järgmisi näitajaid: gonaadide toimimine, innatsükkel, spermatosoidide küpsemine munandimanustes, paaritumiskäitumine, viljastumine, tiinus, poegimine ja imetamine. Lisaks võimaldab arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse ja arenguhäireid põhjustava immuuntoksilisuse kohta saadav teave iseloomustada mõju nimetatud süsteemidele. Nende katsetega saadavad andmed peaksid võimaldama määrata täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldava doosi (NOAEL), vähima täheldatavat kahjulikku toimet avaldava doosi (LOAEL) ja/või võrdlusdoosid mitmesuguste näitajate puhul ning võimaldama selgitada varasemates korduvdoosi uuringutes täheldatud mõju või aitama kavandada edasisi uuringuid.

6. Katse-eeskirja skeem on esitatud joonisel 1. Uuritavat kemikaali manustatakse erinevates doosides pidevalt mitmele suguküpsete isas- ja emasloomade rühmale. Vanemate (P) põlvkonna katseloomadele manustatakse kemikaali teatava aja jooksul enne paaritumist (aeg valitakse uuritava kemikaali kohta teadaoleva teabe alusel, kuid vähemalt kaks nädalat) ja kahenädalase paaritumisperioodi ajal. P isasloomadele manustatakse kemikaali vähemalt kuni F_1-järglaste võõrutamiseni. Kemikaali tuleks neile manustada vähemalt 10 nädala jooksul. Kemikaali võib manustada ka kauem, kui on vaja selgitada mõju paljunemisele. P-põlvkonna emasloomadele jätkatakse kemikaali manustamist tiinuse ja imetamise ajal kuni katse lõpetamiseni pärast järglaste võõrutamist (st 8–10 nädalat). F_1-järglastele manustatakse uuritavat kemikaali edasi võõrutusperioodist kuni täiskasvanuks saamiseni. Kui hinnatakse teist põlvkonda (vt OECD juhenddokument nr 117 (39)), jätkatakse F_1-järglastele kemikaali manustamist kuni F_2-põlvkonna võõrutamiseni või uuringu lõpetamiseni.

7. Kõikidel loomadel tehakse kliinilisi vaatlusi ja patoloogilisi uuringuid mürgistuse sümptomite tuvastamiseks; erilist tähelepanu pööratakse isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemi rikkumatusele ja selle toimimisele, samuti järglaste tervisele, kasvule, arengule ja toimimisele. Võõrutamise ajal määratakse valitud järglased allrühmadesse (kohordid 1–3, vt punktid 33 ja 34 ning joonis 1) edasiseks uurimiseks, mis hõlmab seksuaalse küpsemise, suguelundite struktuurikahjustuste ja toimimise, neuroloogiliste ja käitumuslike näitajate ning immuunfunktsioonide uurimist.

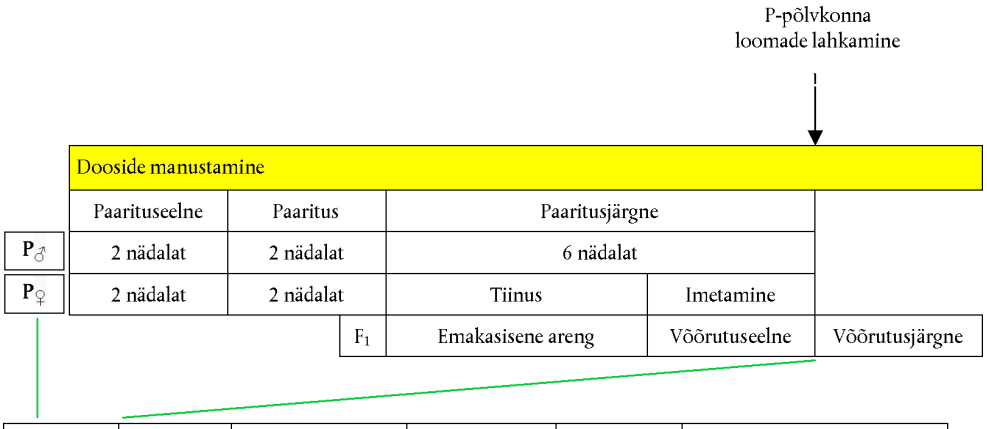
8. Uuringu tegemisel järgitakse juhtpõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19 ohutuse hindamisel kasutatavatel katseloomadel avalduvate kliiniliste tunnuste kui humaansete näitajate kindlakstegemise, hindamise ja kasutamise kohta (34).

▼M5

9. Kui on olemas piisav arv uuringuid, et teha kindlaks uue uurimismeetodi mõju, vaadatakse katsemeetod läbi ja vajaduse korral muudetakse, et võtta arvesse saadud kogemused.

Joonis 1

Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu skeem



Vanemate põlvkond	Kohort	Otstarve	Loomi/kohort	Suguküpsuse saabumine	Ligikaudne vanus lahkamisel (nädalad)
Eesmärk on 20 pesakonda/ rühm	1A	Reproduktiivtoks	20 M + 20 N	Jah	13
	1B	Reproduktiivtoks	20 M + 20 N	Jah	14 või 20–25, kui algatatakse
	2A	Neurotoksilisus	10 M + 10 N @	Jah	11-12
	2B	Neurotoksilisus	10 M + 10 N @	Ei	3
	3	Immuuntoksilisus	10 M + 10 N @	Jah	8
	Ülejääk	Varuloomad		Ei	3

@ üks pesakonna kohta ja esindab võimaluse korral kokku 20 pesakonda

MEETODI KIRJELDUS JA KATSE ETTEVALMISTAMINE

Loomad

Loomaliigi ja -liini valimine

10. Reproduktiivtoksilisuse katses kasutatava loomaliigi valimist tuleks hoolikalt kaaluda ja võtta arvesse kogu kättesaadav teave. Kuna rotiga on olemas väga palju taustaandmeid ja on võimalikud võrdlused üldise mürgisuse katsetega, on eelistatud liigiks tavaliselt rott ning käesolevas meetodi kirjelduses esitatud kriteeriumid ja soovitused kehtivad roti kohta. Kui kasutatakse muud liiki, tuleks seda põhjendada ja teha asjaomased muudatused katse-eeskirjas. Liine, kellel on madal sigivus või kellel teatakse olevat iseeneslikke arenguhäireid, ei tohiks kasutada.

Vanus, kehamass ja katses kasutamise kriteeriumid

11. Vanematena (*parent*, P) tuleks kasutada terveid loomi, keda ei ole varem katsetes kasutatud. Tuleks uurida nii isas- kui ka emasloomi ja emasloomad peaksid olema poegimata ja mitte tiined. P-loomad peaksid olema saavutanud suguküpsuse, olema dooside manustamise alguses sarnase kehamassiga (samast soost loomade hulgas), olema paaritamise ajal sarnases vanuses (ligikaudu 90 päeva) ning olema tüüpilised uuringus kasutatava loomaliigi ja -liini jaoks. Loomadel tuleks pärast saabumist lasta vähemalt 5 päeva aklimatiseeruda. Loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja doosirühmadesse niimoodi, et rühmades olevate loomade kehamassi keskväärtused oleksid võrreldavad (st ±20 % keskväärtusest).

▼**M5**

Pidamis- ja söötmistingimused

12. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (±3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema 30–70 %, ideaaljuhul 50–60 %. Kunstlik valgustus peaks olema järgmine: 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Kasutada võib tavapärast katseloomadele ettenähtud sööta ning joogivee hulk peab olema piiramatu. Erilist tähelepanu tuleks pöörata sööda fütoöstrogeenisisaldusele, kuna fütoöstrogeenide suur sisaldus söödas võib mõjutada reproduktiivfunktsiooni määratavaid näitajaid. Soovitatakse kasutada standarditud, teadaoleva koostisega sööta, milles östrogeensete kemikaalide sisaldus on vähendatud (2, 30). Söödavalikut võib mõjutada vajadus kindlustada sobiva lisasegu lisamine, kui uuritavat kemikaali manustatakse sellisel viisil. Tuleks määrata uuritava kemikaali sisaldus, homogeensus ja stabiilsus kandeaines. Söödas ja joogivees tuleks korrapäraselt määrata saasteainete sisaldus. Uuringu ajal kasutatud iga söödapartii proovid tuleks säilitada sobivates tingimustes (nt külmutatult –20 °C juures) kuni uuringu lõpuni juhuks, kui tulemustest selgub, et sööda komponente oleks vaja täiendavalt uurida.

13. Loomad peavad olema puurides väikeste rühmadena, igas puuris on samast soost ja sama doosirühma loomad. Loomi võib hoida ka üksikult, et vältida võimalikke vigastusi (nt isasloomad pärast paaritumisperioodi). Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud sobivates puurides. Kui on saadud tõendid kopulatsiooni kohta, paigutatakse tiineks peetavad emasloomad eraldi poegimis- või pesakonnapuuridesse ja varustatakse nad ettenähtud sobiva ja kindlaksmääratud pesamaterjaliga. Pesakondi peetakse koos emaga kuni võõrutamiseni. F_1-loomi tuleb pidada väikeste rühmadena, igas puuris on samast soost ja sama doosirühma loomad võõrutusperioodist kuni uuringu lõpetamiseni. Kui see on teaduslikult põhjendatud, võib loomi pidada üksikult. Fütoöstrogeenide sisaldus valitud allapanumaterjalis peaks olema minimaalne.

Loomade arv ja märgistamine

14. Tavaliselt peaks igas doosi- ja kontrollrühmas olema piisav arv paarituvaid loomi, nii et igas doosirühmas oleks vähemalt 20 tiinet emaslooma. Eesmärk on saada piisavalt tiinusjuhtumeid, et oleks võimalik mõistlikult hinnata kemikaali võimet mõjutada P-põlvkonna viljakust, tiinust ja vanemakäitumist ning F_1-põlvkonna järglaste kasvu ja arengut viljastumisest kuni suguküpsuseni. Kui vajalikku arvu tiineid loomi ei saada, ei tähenda see veel tingimata katse kehtetuks tunnistamist; iga üksikjuhtu tuleb eraldi hinnata ja kaaluda, kuivõrd see võib mõjutada uuritava kemikaali hindamist.

15. Igale P-loomale omistatakse kordumatu tunnusnumber enne dooside manustamise algust. Kui varasemad laboriandmed näitavad, et olulisel osal emasloomadest ei tarvitse esineda korrapäraseid innatsükleid (4 või 5 päeva), soovitatakse enne dooside manustamise algust hinnata innatsükleid. Alternatiivina võib rühmasid suurendada, et vähemalt 20 emasloomal igas rühmas oleksid tagatud korrapärased innatsüklid (4 või 5 päeva) dooside manustamise alguses. Vastsündinute esmakordsel vaatlusel sündimispäeval või sündimisele järgneval päeval (*postnatal day*, PND) 0 või 1 märgistatakse kõik F_1-järglased kordumatu märgisega. Andmeid F_1-järglaste ja, vajaduse korral, F_2-järglaste päritolupesakonna kohta tuleb säilitada kogu uuringu jooksul.

▼M5

Uuritav kemikaal

Olemasolev teave uuritava kemikaali kohta

16. Oluline on läbi vaadata olemasolev teave, et teha otsused manustamisviisi, kandeaine, loomaliigi, dooside valiku kohta, samuti otsused dooside manustamise ajakava võimaliku muutmise kohta. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu kavandamisel tuleks seepärast võtta arvesse kogu asjakohane olemasolev teave: uuritava kemikaali füüsikalis-keemilised ja toksiko-kineetilised omadused (sealhulgas liigispetsiifiline metabolism), toksikodünaamilised omadused, struktuuri-aktiivsuse sõltuvused (SAR), *in vitro* kindlaks tehtud metaboolsed protsessid, mürgisuse uuringute tulemused ja asjakohane teave struktuurianaloogide kohta. Esialgset teavet imendumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamise (ADME) ning bioakumulatsiooni kohta võib tuletada keemilisest struktuurist, füüsikalis-keemilistest andmetest, plasmavalkude sidumise ulatusest või toksiko-kineetilistest (TK) uuringutest, samal ajal kui mürgisusuuringute tulemused annavad lisateavet, nt NOAELi, metabolismi või selle indutseerimise kohta.

Toksiko-kineetiliste andmete kaalumine

17. Kuigi TK andmeid ei nõuta, võivad varasemad TK andmed doosivahemiku määramise või muudest katsetest olla uuringu kavandamisel, dooside valimisel ja tulemuste tõlgendamisel olla väga kasulikud. Eriti kasulikud on andmed, mis: 1) lubavad kontrollida areneva loote ja poegade kokkupuudet uuritava kemikaaliga (või asjakohaste metaboliitidega), 2) võimaldavad saada sisemise dosimeetria hinnangu ja 3) võimaldavad hinnata võimalikke doosist sõltuvaid küllastunud kineetilisi protsesse. Täiendavaid TK andmeid, näiteks metaboliidiprofiile, kontsentratsiooni-aja kõveraid jne, tuleks samuti arvesse võtta, kui need on kättesaadavad. Täiendavaid TK andmeid võib koguda ka põhikatse ajal tingimusel, et see ei takista põhiuuringu näitajate kogumist ja tõlgendamist.

Üldjuhul on laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu kavandamisel kasulikud järgmised TK andmed:

— hiline tiinus (nt 20. päev pärast tiinestumispäeva) — emalooma veri ja loote veri;

— keskmine imetamisperiood (PND 10) — ema veri, järglaste veri ja/või piim;

— varajane võõrutusjärgne periood (nt PND 28) — võõrutatud poegade vereproovid.

Konkreetsete analüüsitavate ainete (nt lähtekemikaal ja/või metaboliidid) ja proovivõtmise kava kindlaksmääramisel tuleks olla paindlik. Näiteks sõltub teataval proovivõtupäeval võetavate proovide arv ja võtmise aeg kokkupuutumisteest ja eelteadmistest TK omaduste kohta mittetiine looma puhul. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, on piisav, kui proove võetakse kõikidel päevadel ühel sobival ajal; dooside manustamisel sondi kaudu võib vaja olla täiendavaid proovivõtuaegu, et saaks paremini hinnata sisemiste dooside vahemikku. Siiski ei ole vaja ühelgi proovide võtmise päeval saada kontsentratsiooni ajast sõltuvuse täielikku kõverat. Vajaduse korral võib ühes pesakonnas kummastki soost loodete ja vastsündinute vereproovid koondada.

▼M5

Manustamistee

18. Manustamistee valimisel tuleks arvestada kokkupuuteviise, mis on inimese kokkupuute puhul kõige asjakohasemad. Kuigi katse-eeskiri on koostatud nii, et uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib seda muuta, et manustada kemikaali muul viisil (joogivee, sondi kaudu, sissehingamise teel, naha kaudu), olenevalt kemikaali omadustest ja teabest, mida tahetakse saada.

Kandeaine valimine

19. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Soovitatakse võimaluse korral kaaluda kõigepealt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/õlisuspensiooni (nt maisiõli) kasutamist. Muu kandeaine kui vee puhul tuleks teada kandeaine mürgiseid omadusi. Tuleks vältida selliste kandeainete kasutamist, mis võivad ise olla mürgised (nt atsetoon, dimetüülsulfoksiid). Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kandeaine või muu lisaaine kasutamisel tuleks kaaluda järgmist: nende mõju uuritava kemikaali imendumisele, jaotumisele, metabolismile või peetumisele organismis; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võib muuta selle toksilisi omadusi, ning mõju loomade sööda- või veetarbimisele või toitumusele.

Doosi valimine

20. Tavaliselt peaks uuring hõlmama vähemalt kolme doosimäära ja samaaegset kontrolli. Sobiva doositaseme valimisel peab uurija arvestama kogu kättesaadavat teavet, sealhulgas varasemate uuringutega dooside kohta saadud teavet, tiinete ja mittetiinete loomadega saadud toksiko-kineetilisi andmeid, imetamisel piimaga edasikandumise ulatust ja inimeste kemikaaliga kokkupuute hinnanguid. Kui on olemas TK andmed, mis näitavad TK-protsesside küllastumist dooside suurendamise korral, tuleks vältida suurte dooside kasutamist, mille juures selgelt esineb küllastumine, loomulikult tingimusel, et inimeste kokkupuude on eeldatavasti tunduvalt allpool küllastumispunkti jõudmist. Sellistel juhtudel peaks suurim doos olema murdepunkti kohal või veidi üle selle punkti, kus algab mittelineaarne toksiko-kineetika.

21. Kui asjakohased TK andmed puuduvad, peaksid doositasemed põhinema mürgisusel, kui neid ei piira uuritava kemikaali füüsikalis-keemilised omadused. Kui doositasemed põhinevad mürgisusel, valitakse kõrgeim doos nii, et see põhjustaks teatavat süsteemset toksilisust, kuid mitte loomade surma ega tõsiseid kannatusi.

22. Doosimäärade alanev järjestus tuleks valida nii, et näidata doosiga seotud mõju ja teha kindlaks täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldav doos või mõju avastamise piiri lähedane doos, mis võimaldaks leida võrdlusdoosi kõige tundlikuma(te) näitaja(te) jaoks. Sageli on optimaalsed kahe- või neljakordsed dooside vahemikud, et dooside vahemik NOAELi ja LOAELi vahel ei oleks liiga suur. Väga suure doosivahemiku (nt üle 10 korra) kasutamisele on sageli eelistatav neljanda doosirühma lisamine.

23. Kontrollrühma loomi koheldakse samamoodi kui doosirühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kontrollrühm on rühm, kellele doose ei manustata või manustatakse kahjutut ainet või kandeainet, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet suurimas kasutatud mahus.

▼M5

Piirsisalduskatse

24. Kui korduvdoosi uuringutes ei ole leitud tõendeid mürgisuse kohta doosis vähemalt 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas või kui andmete põhjal, mis on saadud struktuuri või metabolismi poolest sarnaste kemikaalidega (metabolism on *in vivo* või *in vitro* andmete järgi sarnane), ei pruugi mitme doositasemega uuring olla vajalik. Sellisel juhul võiks laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu teha kontrollrühma ja ainult ühe doosirühmaga, milles doos on 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Kui aga sellise piirsisalduskatsega leitakse tõendeid reproduktiivtoksilisuse või arenguhäireid põhjustava toksilisuse kohta, tuleb teha uuring madalamate doositasemetega, et leida NOAEL. Sellised kaalutlused piirsisalduskatse kohta kehtivad ainult juhul, kui inimese kokkupuude ei viita sellele, et on vaja uurida kõrgemat doositaset.

EESKIRJAD

Järglaste kokkupuude

25. Kemikaali manustamine sööda kaudu on eelistatud meetod. Sondiuuringute tegemise kohta tuleks märkida, et imetatavad pojad saavad uuritavat kemikaali tavaliselt üksnes kaudselt, piimaga; otsene dooside manustamine algab nende jaoks võõrutamise ajal. Sööda või joogiveega manustamise uuringutes hakkavad pojad uuritavat kemikaali otse saama siis, kui nad imetamisperioodi viimasel nädalal hakkavad ise sööma. Kui uuritavat kemikaali eritub piima sisse vähe ja kui ei saa tõendada järglaste pidevat kokkupuudet kemikaaliga, tuleks kaaluda uuringu korralduse muutmist. Sellistel juhtudel tuleks kaaluda vahetut manustamist poegadele imetamise ajal, võttes arvesse TK kohta olemas olevat teavet, toksilisust järglastele või muutusi biomarkerites (3, 4). Enne imetatavatele poegadele dooside otsese manustamise uuringu tegemist tuleks hoolikalt kaaluda eeliseid ja puudusi (5).

Doseerimise ajakava ja doseerimine

26. Teave innatsüklite, isas- ja emassuguelundite histopatoloogia ja munandi/-munandimanuse spermaanalüüsi kohta võib olla juba varem saadud piisavalt pikkade korduvdoosiuuringutega. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringus valitakse paarituseelse dooside manustamise kestus nii, et näha mõju funktsionaalsetele muutustele, mis võivad segada paaritumiskäitumist ja viljastamist. Paarituseelne dooside manustamine peab olema piisavalt pikk, et saavutada püsioleku kokkupuutetingimused P põlvkonna emas- ja isasloomade puhul. Enamikul juhtudest peetakse mõlema soo puhul piisavaks kahenädalast dooside manustamist enne paaritumist. Emasloomade puhul hõlmab see 3–4 täielikku innatsüklit ja see peaks olema piisav, et avastada kõik kahjulikud mõjud innatsüklile. Isasloomade puhul vastab see ajale, mis kulub küpseva spermatosoidi liikumiseks läbi munandimanuse, ja see peaks lubama avastada paaritamisel munandijärgse mõju spermale (spermatogeneesi lõppstaadiumides ja munandimanuses küpsemise ajal). Uuringu lõpetamise ajaks, kui uuritakse munandi ja munandimanuse histopatoloogiat ja tehakse sperma näitajate analüüs, on P- ja F_1-põlvkonna isasloomad uuritava kemikaaliga kokku puutunud vähemalt ühe täieliku spermatogeneesi protsessi jooksul (6, 7, 8, 9) ja OECD juhenddokument nr 151 (40)).

▼M5

27. Paaritumiseelse kokkupuute stsenaariume isasloomade puhul võiks kohandada, kui varasemate uuringutega on selgelt kindlaks tehtud mürgisus munandite jaoks (spermatogeneesi häired) või mõjud seemnerakkude struktuurile ja funktsioonile. Samamoodi võib emasloomade puhul olla põhjendatud kokkupuutestsenaariumi muutmine, kui on teada, et uuritav kemikaal mõjutab innatsüklit ja seega tiinestumisvõimet. Erijuhtudel võib olla lubatav, et P-põlvkonna emasloomadele hakatakse uuritavat kemikaali manustama alles pärast seda, kui on saadud sperma suhtes positiivne tupeäie (vt OECD juhenddokument nr 151 (40)).

28. Kui paaritumiseelne kemikaali manustamise periood on kindlaks määratud, tuleks uuritavat kemikaali loomadele pidevalt manustada 7 päeval nädalas kui lahkamiseni. Kõigile loomadele tuleks uuritavat kemikaali manustada sama meetodiga. Dooside manustamist tuleks jätkata 2-nädalase paaritumisperioodi jooksul ja P-põlvkonna emasloomadele kogu tiinuse ja imetamise vältel kuni uuringu lõpetamiseni pärast võõrutamist. Isasloomadele tuleb doose manustada samal viisil kuni katse lõpetamiseni, kui F_1-põlvkonna loomad võõrutatakse. Lahkamise juures tuleks eelkõige pidada kinni emaste lahkamise ajakavast, kuna emasloomad tuleks lahata ühel ja samal või lähedasel imetamispäeval. Isasloomade lahkamine võib jaotuda suuremale arvule päevadele, olenevalt labori võimalustest. Kui otsest dooside manustamist ei ole alustatud juba imetamise ajal, alustatakse valitud F_1-põlvkonna isas- ja emasloomadele kemikaali otsest manustamist võõrutamise ajal ja seda tuleks jätkata kuni kavandatud lahkamiseni, sõltuvalt kohorti määramisest.

29. Kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehamassile; valitud võimalus tuleks selgelt määratleda.

30. Kui uuritavat kemikaali manustatakse sondiga, ei tohiks ühe korraga manustatav vedelikukogus ületada tavaliselt 1 ml 100 g kehamassi kohta (õli, näiteks maisiõli puhul on maksimumkogus 0,4 ml 100 g kehamassi kohta). Välja arvatud ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide dooside korral jääks samaks. Doos tuleks manustada iga päev samal kellaajal. Iga looma doos peab tavaliselt põhinema kõige viimaselkehamassi määramisel ja seda kohandatakse vähemalt kord nädalas täiskasvanud isas- ja täiskasvanud viljastamata emaslooma puhul ning iga kahe päeva järel tiine emaslooma ja F_1-põlvkonna loomadel, kui kemikaali manustatakse enne võõrutamist ja 2 nädala jooksul pärast võõrutamist. Kui TK andmed viitavad uuritava kemikaali vähesele ülekandele läbi platsenta, tuleb tiinuse viimasel nädalal võib-olla kohandada sondiga manustatavat doosi, et vältida tiinele emasloomale liiga mürgise doosi manustamist. Emasloomale ei tohiks poegimise päeval kemikaali manustada sondiga või muul viisil, mille juures emasloom tuleb kätte võtta; kemikaali manustamata jätmine sel päeval on parem kui poegimisprotsessi häirimine.

▼M5

Paaritumine

31. Iga P-põlvkonna emane tuleks panna ühte puuri ühe juhuslikult valitud mitte suguluses oleva isasloomaga, kes kuulub samasse doosirühma (paaritamine 1: 1), kuni täheldatakse kopulatsiooni tõendeid või on möödunud 2 nädalat. Kui isasloomi ei ole piisavalt, kuna isasloomi on näiteks surnud enne paaritumist, võib panna juba paaritunud (1: 1) isaslooma kokku teise emasloomaga, nii et kõik emasloomad saavad paaritatud. Tiinuse 0-päevaks peetakse päeva, mil leitakse tõendeid paaritumise kohta (leitakse vaginaalkork või spermat). Loomad tuleks teineteisest võimalikult kiiresti eraldada pärast tõendite saamist kopulatsiooni toimumise kohta. Kui paaritumine ei ole kahe nädala pärast toimunud, tuleks loomad eraldada, andmata neile täiendavat võimalust paaritumiseks. Paaritunud paarid tuleks andmetes selgesti ära näidata.

Pesakonna suurus

32. Neljandal poegimisjärgsel päeval võib iga pesakonna suurust korrigeerida, eemaldades juhuvalikuga liigsed pojad nii, et tulemuseks oleks võimalikult täpselt viis emast ja viis isast pesakonna kohta. Poegade selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi põhjal, ei ole sobiv. Kui emaste või isaste poegade arv ei võimalda koostada pesakonda viiest kummastki soost pojast, on sobiv ka osaline korrigeerimine (nt kuus isast ja neli emast).

Poegade valimine võõrutusjärgsete uuringute jaoks (vt joonis 1)

33. Võõrutamisel (umbes päeval PND 21) valitakse kõigist kättesaadavatest pesakondadest pojad edasiseks uurimiseks, kuni 20 poega igasse doosirühma ja kontrollrühma, ning peetakse neid kuni suguküpsuse saabumiseni (kui katseid ei ole vaja teha varem). Pojad valitakse juhuvaliku alusel, kuid välja jäetakse ilmselt kängujäänud pojad (loomad, kelle kehamass erineb keskmisest sama pesakonna järglase kaalust rohkem kui kahe standardhälbe võrra), kuna selliseid poegi ei saa pidada katserühma suhtes esindavaks.

Päeval PND 21 määratakse väljavalitud F_1-põlvkonna pojad juhuvaliku alusel ühte loomade kolmest kohordist:

kohort 1 (1A ja 1B) = reproduktiivtoksilisuse/arenguhäireid põhjustava toksilisuse katse;

kohort 2 (2A ja 2 B) = arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse;

kohort 3 = arenguhäireid põhjustava immuuntoksilisuse katse.

Kohort 1A: üks isas- ja üks emasloom/pesakond/rühm (20/sugu/rühm): eelistatud valik reproduktiivsüsteemi ja üldise mürgisuse esmaseks hindamiseks.

Kohort 1B: üks isas- ja üks emasloom/pesakond/rühm (20/sugu/rühm): eelistatud valik paljunemisfunktsiooni hindamiseks paarituvatel F1-loomadel, kui seda hinnatakse (vt OECD juhenddokument nr 117 (39), ja täiendavate histopatoloogiaandmete saamiseks, kui kahtlustatakse reproduktiivsüsteemi või sisesekretsiooni kahjustavat mürgisust või kui kohordi 1A tulemused ei ole ühesed.

Kohort 2A: kokku 20 poega rühma kohta (10 isast ja 10 emast rühma kohta; üks isasloom ja üks emasloom pesakonna kohta), mis eraldatakse käitumishäirete neuroloogia uurimiseks. millele järgneb täiskasvanute neurohistopatoloogiline hindamine.

Kohort 2B: kokku 20 poega rühma kohta (10 isast ja 10 emast rühma kohta; üks isas- ja üks emasloom pesakonna kohta), mis määratakse neurohistopatoloogiauuringuks võõrutamise ajal (PND 21 või PND 22). Kui loomi ei ole piisavalt, tuleb loomad esmalt määrata kohorti 2A.

▼M5

Kohort 3: kokku 20 poega rühma kohta (10 isast ja 10 emast rühma kohta; üks poeg igast pesakonnast kui võimalik). Vaja võib minna täiendavaid poegi kontrollrühmast, et nad toimiksid positiivse kontrolli loomadena T-rakkudest sõltuva antikehareaktsiooni katses (*T-cell dependant antibody response assay*, TDAR) päeval PND 56 ± 3.

34. Kui pesakonnas ei ole piisavalt poegi kõigi kohortide komplekteerimiseks, on eelistatav kohort 1, kuna seda saab laiendada F_2-põlvkonna saamiseks. Konkreetse küsimuse lahendamiseks võib igasse kohorti määrata täiendavaid poegi, näiteks kui kemikaalil kahtlustatakse neuro-, immuun- või reproduktiivtoksilisust. Selliseid poegi võib kasutada uuringuteks eri ajahetkedel või täiendavate näitajate määramiseks. Pojad, keda kohortidesse ei määrata, kasutatakse kliinilise biokeemia analüüsideks (punkt 55) ja üldiseks lahkamiseks (punkt 68).

P-loomade teine paaritamine

35. Teist paaritamist P-loomade puhul tavaliselt ei soovitata, kuna sellega kaotatakse olulist teavet pesastumiskohtade arvu kohta (ja sellega pesastumisjärgselt ja sünni läheduses hukkunud loodete arvu kohta, mis võib näidata aine võimalikku teratogeensust) esimese pesakonna puhul. Kui on vaja kontrollida või selgitada kemikaali mõju kemikaaliga kokkupuutunud emasloomadele, siis on parem laiendada uuringut ja lisada F_1-põlvkonna paaritumine. Siiski on P-põlvkonna isasloomade teine paaritumine töötlemata emasloomadega alati üks võimalus, millega saab selgitada vastuolulisi tulemusi või täiendavalt iseloomustada mõju viljakusele, mida täheldati esimesel paaritumisel.

ELUPUHUSED VAATLUSED

Kliinilised vaatlused

36. P-põlvkonna ja valitud F_1-põlvkonna loomade üldine kliiniline vaatlus tehakse kord päevas. Kemikaali sondi kaudu manustamise korral tuleks kliinilised vaatlused teha enne ja pärast manustamist (et näha võimalikke toksilisuse märke, mis on seotud maksimaalse kontsentratsiooniga vereseerumis). Asjakohased käitumise muutused, raske või pikaleveniva poegimise märgid ja kõik mürgistuse tunnused tuleks registreerida. Kaks korda päevas, nädalavahetusel kord päevas tuleks kontrollida kõiki loomi raske mürgistuse, haigestumise või surma tuvastamiseks.

37. Lisaks uuritakse iga nädal üksikasjalikumalt kõiki P- ja F_1-põlvkonna loomi (pärast võõrutamist) ja kõige parem oleks seda teha looma kaalumise ajal, et vähendada kättevõtmisega seotud stressi. Vaatlused tuleks teha hoolikalt ja kõik leiud registreerida, kasutades katselaboris määratud punktisüsteeme. Tuleks püüda tagada, et katsetingimuste varieeruvus oleks minimaalne. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised märgid: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestadel, eritiste ja väljaheidete esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus, muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad kättevõtmisele reageerivad, samuti kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldus, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi kõndimine).

▼M5

Kehamass ja sööda/vee tarbimine

38. P-põlvkonna loomad kaalutakse dooside manustamise esimesel päeval ja seejärel vähemalt kord nädalas. Lisaks kaalutakse P-põlvkonna emasloomi imetamise ajal samadel päevadel, kui kaalutakse nende pesakonna poegi (vt punkt 44). Kõik F_1-põlvkonna loomad kaalutakse individuaalselt võõrutamisel (PND 21) ja seejärel vähemalt kord nädalas. Kehamass registreeritakse ka päeval, kui loomal algab puberteet (eesnaha täielik eraldumine või tupe avanemine). Kõik loomad kaalutakse surmamisel.

39. Uuringu ajal registreeritakse sööda ja vee tarbimine (kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega) vähemalt kord nädalas samal päeval looma kehamassi registreerimisega (välja arvatud kooselu ajal). Iga puuri F_1-põlvkonna loomade söödatarbimine registreeritakse iga nädal, alates teatavasse kohorti valimisest.

Innatsüklid

40. Eelteave innatsükli muutuste kohta uuritava kemikaali toimel võib olla saadud juba varasemate korduvdoosi mürgisuse uuringutega ja seda võib kasutada konkreetse uuritava kemikaaliga tehtava laiendatud ühe-põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu eeskirja koostamisel. Tavaliselt alustatakse innatsükli hindamist (vaginaaltsütoloogia abil) dooside manustamise alguses ja jätkatakse kuni paaritumise kinnituse saamiseni või kahenädalase paaritumisaja lõpuni. Kui emasloomi on enne dooside manustamist kontrollitud tavalise innatsükli seisukohast, siis on kasulik jätkata tupenõre äiete tegemist pärast dooside manustamise algust, kuid kui dooside manustamise alguses tekib kahtlus, et esineb mittespetsiifilist mõju (näiteks sööda tarbimise ilmne vähenemine kohe alguses), võib lasta loomadel dooside manustamisega kohaneda enne kahenädalast tupenõre äiete tegemise perioodi, millele järgneb paaritamine. Kui emasloomale kemikaali manustamist niimoodi pikendatakse (st neljanädalane dooside manustamine enne paaritumist), tuleks kaaluda nooremate loomade ostmist ja pikendada isasloomadele dooside manustamist enne paaritumist. Tupe-/emakakaelarakkude võtmisel tuleks olla ettevaatlik, et vältida limaskesta kahjustamist ja seejärel pseudotiinuse teket (10, 11).

41. Tupenõre äigeid tuleks uurida iga päev kõikide kohorti 1A kuuluvate F_1-põlvkonna emasloomade puhul pärast seda, kui tupp on avanenud, kuni leitakse esimene sarvestunud rakke sisaldav äie, et teha kindlaks ajavahemik nende kahe sündmuse vahel. Kõigi kohorti 1A kuuluvate F_1-põlvkonna emasloomade innatsükleid tuleks jälgida kahe nädala jooksul, alates umbes päevast PND 75. Lisaks sellele, kui F_1-põlvkonna paaritumine peaks olema vajalik, jälgitakse kohordi 1B tupe tsütoloogiat alates loomade paaridesse paigutamisest kuni kopulatsiooni tõendite saamiseni.

Paaritumine ja tiinus

42. Lisaks tavapärastele näitajatele (nt kehamass, sööda tarbimine, kliinilised tähelepanekud, sealhulgas surma ja haigestumuse kontroll) registreeritakse paaridesse paigutamise, eostamise ja poegimise kuupäev ning arvutatakse ühtimiseelne ajavahemik (paaridesse paigutamisest kuni eostamiseni) ja tiinusaeg (eostamisest kuni poegimiseni). P-põlvkonna emasloomi tuleks hoolikalt uurida eeldatava poegimistähtaja ümbruses, et teha kindlaks poegimishäirete tunnused. Registreerida tuleks kõik pesaehituskäitumise või pesakonna eest hoolitsemise kõrvalekalded.

▼M5

43. Poegimispäev võetakse imetamispäevaks 0 (LD 0) emaslooma puhul ja sünnijärgseks päevaks 0 (PND 0) järglaste puhul. Teise võimalusena võivad kõik võrdlused põhineda ühtimisjärgsel ajal, et vältida segadust sünnijärgse arengu kirjeldamisel, mis on tingitud erinevast tiinusajast; siiski tuleb registreerida ka poegimisel põhinev ajakava. See on eriti oluline, kui uuritav kemikaal mõjutab tiinuse kestust.

Järglaste näitajad

44. Iga pesakonda vaadeldakse nii ruttu kui võimalik pärast poegimist (PND 0 või 1), et kindlaks määrata poegade arv ja sugu, surnult sünnid, elussünnid ja kõik suuremad anomaaliad (väliselt nähtavad kõrvalekalded, sh suulaelõhe; nahaalused verevalumid; ebanormaalne naha värvus või tekstuur; nabaväädi olemasolu; piima puudumine maos; kuivanud eritiste esinemine). Lisaks peaks vastsündinute esimene kliiniline läbivaatus hõlmama kehatemperatuuri, aktiivsusseisundi ja kättevõtmisele reageerimise kvalitatiivset hindamist. Poegi, kes leitakse surnult päeval PND 0 või hiljem, tuleks uurida, et teha kindlaks võimalikud puuded ja surma põhjus. Elusad pojad loetakse kokku ja kaalutakse ükshaaval päeval PND 0 või 1 ja edaspidi korrapäraselt, näiteks päevadel PND 4, 7, 14 ja 21. Kliinilisi vaatlusi tuleks loomade vanust arvestades korrata järglaste kaalumise ajal või sagedamini juhul, kui vastsündinul leiti mingeid konkreetseid puudeid. Täheldatavad tunnused võiksid muu hulgas hõlmata järgmist: välised anomaaliad, naha, karvastiku, silmade ja limaskestade muutused, eritiste ja väljaheidete esinemine ja autonoomse närvisüsteemi tegevuse muutused. Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad kättevõtmisele reageerivad, samuti kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid või kummaline käitumine.

45. Iga poja anogenitaalne vahemaa (*anogenital distance*, AGD) tuleks mõõta vähemalt üks kord ajavahemikus PND 0–4. Järglaste kehamassi andmed tuleks koguda AGD mõõtmise päeval ja AGD tuleks normeerida poja suurust arvestava näitajaga, eelistatult kuupjuurega kehamassist (12). Isastel järglastel tuleks rinnanibude ja nibuväljakese olemasolu kontrollida päeval PND 12 või 13.

46. Kõiki väljavalitud F_1-põlvkonna loomi hinnatakse iga päev sugutiluki ja eesnaha eraldumise (isasloom) või tupe avanemise (emasloom) suhtes, alustades juba enne nende seksuaalse küpsuse näitajate saavutamise eeldatavat aega, et teha kindlaks varane seksuaalne küpsemine. Registreerida tuleks kõik suguorganite kõrvalekalded, nagu püsimajääv tupevahesein, kusiti alumise seina sulgumatus või peeniselõhe. F_1-põlvkonna loomade seksuaalset küpsust võrreldakse nende füüsilise arenguga, selleks määratakse vanus ja kehamass suguti ja eesnaha eraldumisel (isasloom) või tupe avanemisel (emasloom) (13).

Võimaliku arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse hindamine (kohordid 2A ja 2B)

47. Neurotoksilisuse hindamiseks kasutatakse 10 isas- ja 10 emaslooma kohordist 2A ning 10 isas- ja 10 emaslooma kohordist 2B igast doosirühmast (kumbagi kohorti lähevad 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast; iga pesakonda esindab vähemalt 1 järglane; kõik on valitud juhuvalikuga). Kohordi 2A loomadel kontrollitakse helisignaalile reageerimist, tehakse funktsionaalvaatluste kompleksi katsed, kontrollitakse motoorset aktiivsust (vt punktid 48–50) ja hinnatakse neuropatoloogiat (vt punktid 74–75). Tuleks püüda tagada, et kõikide katsetingimuste varieeruvus oleks võimalikult väike ja et ei oleks süstemaatilist viga mõne doosirühma suhtes.

▼M5

Muutujate hulgas, mis võivad käitumist mõjutada, on helivaljuse tase (nt katkendlik müra), temperatuur, niiskus, valgustus, lõhnad, kellaaeg ja keskkonnapoolsed tähelepanu häirijad. Neurotoksikoloogiliste katsete tulemuste tõlgendamisel tuleks arvesse võtta asjakohaseid varasemaid kontrollrühmaga määratud võrdlusvahemikke. Kohordi 2B loomi tuleks kasutada neuropatoloogilisteks hindamisteks päevadel PND 21 või 22 (vt punktid 74 ja 75).

48. Helisignaali katse tuleks teha päeval PND 24 (±1 päev), kasutades kohorti 2A kuuluvaid loomi. Katse tegemise päev peaks olema kõigi doosirühmade ja kontrollrühmade suhtes tasakaalustatud. Iga katsesessioon koosneb 50 katsest. Helisignaali katse tegemisel määratakse keskmine reaktsiooni amplituud igas 10-katselises plokis (10-katselisi plokke on 5), kusjuures katsetingimusi optimeeritakse, et saavutada sessiooni jooksul toimuv harjumine. Katse tegemise kord peab olema kooskõlas katsemeetodiga B.53 (35).

49. Sobival ajal PND 63 ja PND 75 vahel korraldatakse kõikide kohordi 2A loomadega funktsionaalvaatluste kompleksi katsed ja automatiseeritud motoorse aktiivsuse katse. Nende katsete tegemise kord peab olema kooskõlas katsemeetoditega B.43 (33) ja B.53 (35). Funktsionaalvaatluste kompleks hõlmab looma välimuse, käitumise ja funktsioonide kahjustatuse põhjalikku kirjeldamist. Seda hinnatakse vaatluste järgi algul kodupuuris, pärast üleviimist vaatlemiseks standardväljakule (avamaa), kus loom liigub vabalt, ja manipuleerimiskatsetega. Katsetamine peaks toimuma järjekorras kõige vähem interaktiivsetelt katsetelt kõige interaktiivsematele. 1. liites on esitatud mõõdetavate näitajate loetelu. Kõiki loomi peaks hoolikalt jälgima koolitatud vaatleja, kes ei ole teadlik, mida igale loomale manustatakse, kasutades standarditud korda, et vähendada vaatlejaga seotud varieerumist. Võimaluse korral on soovitatav, et sama vaatleja hindaks kõiki sama katse loomi. Kui see ei ole võimalik, tuleb tõendada, et tulemused ei sõltu vaatlejast. Käitumiskatsete kompleksi iga näitaja puhul kasutatakse selgeid hindamisskaalasid ja punktide andmise kriteeriume. Võimaluse korral tuleks välja töötada objektiivsed kvantitatiivsed vaatlemisnäitajad, mis hõlmavad subjektiivset taseme määramist. Iga looma motoorset aktiivsust katsetatakse eraldi. Vaatlussessioon peab olema piisavalt pikk, et demonstreerida kemikaaliga töötlemata kontrollrühmas sessiooni jooksul tekkivat harjumist. Motoorset aktiivsust tuleks mõõta salvestusseadmega automaatse aparaadi abil, millega saab määrata nii tegevuse hoogustumist kui ka vähenemist (nt tausttegevus, mida seadmega saab mõõta, ei tohiks olla nii vähene, et selle vähenemist ei õnnestu registreerida, ega nii hoogne, et selle edasist hoogustumist ei saa registreerida). Iga seadet tuleb kontrollida standardmeetodiga, et tagada, kuivõrd see on võimalik, eri seadmete mõõtmiste ja eri päevadel toimuvate mõõtmiste usaldusväärsus. Doosirühmade loomad jaotatakse eri seadmete vahel võimalikult tasakaalustatult. Doosirühmade katsed peavad toimuma tasakaalustatult eri aegadel, et tulemusi ei mõjutaks tegevuse ööpäevased rütmid.

50. Kui olemasolev teave viitab vajadusele teha muid funktsionaalseid katseid (nt sensoorseid, sotsiaalseid, kognitiivseid), tuleks need lisada muudele uuringus tehtavatele hindamistele nii, et muid hindamisi ei häiritaks. Kui kõnealuseid katseid tehakse samade loomadega, keda kasutatakse standardses helisignaali katses, funktsionaalvaatluste kompleksi katsetes ja motoorse aktiivsuse katsetes, tuleks kavandada erinevad katsed, et katsete kordumisest tulenev väärtulemuste oht viia miinimumini. Täiendavad uuringud võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused, oodatav mõju või toimemehhanism viitavad mingile konkreetsele neurotoksilise mõju tüübile.

▼M5

Arenguhäireid põhjustava immuuntoksilisuse võimalikkuse hindamine (kohort 3)

51. Päeval PND 56 (±3 päeva) kasutatakse iga doosirühma kohordist 3 10 isas- ja 10 emaslooma (1 isas- ja 1 emasloom pesakonna kohta; iga pesakonda esindab vähemalt 1 järglane; loomad on valitud juhuslikult) T-raku-sõltuvate antikehade reaktsiooni katseks, milles uuritakse primaarset IgM-antikeha reaktsiooni T-raku-sõltuvale antigeenile, nagu lamba punaverelibled (SRBC) või meriteo *Megathura crenulata* hemotsüaniin (KLH), kooskõlas praeguste immuuntoksilisuse kindlakstegemise katse-eeskirjadega (14, 15). Reaktsiooni võib hinnata spetsiifiliste naaste moodustavate rakkude (*plaque-forming cells*, PFC) loendamisega põrnas või SRBC- või KLH-spetsiifilise IgM-antikeha sisalduse määramisega vereseerumis ELISA-analüüsiga reaktsiooni maksimumi ajal. Reaktsioon saavutab tavaliselt maksimumi neli (PFC-reaktsioon) või viis (ELISA) päeva pärast intravenoosset immuniseerimist. Kui primaarset antikehareaktsiooni hinnatakse PFCde loendamisega, siis lubatakse loomade alarühmi hinnata eri päevadel järgmistel tingimustel: alarühma immuniseerimine ja surmamine on ajastatud nii, et PFCd loendatakse reaktsiooni maksimumis; alarühmades on võrdsel hulgal isas- ja emasjärglasi kõikidest doosirühmadest, kaasa arvatud kontrollrühmad, ning alarühmi hinnatakse ligikaudu samas sünnijärgses vanuses.Kokkupuudet uuritava kemikaaliga jätkatakse kuni päevani enne põrnade kogumist PFC-reaktsiooni määramiseks või seerumi võtmist ELISA-analüüsi jaoks.

Võimaliku reproduktiivtoksilisuse järelhindamine (kohort 1B)

52. Kohordi 1B loomadele võib jätkata kemikaali manustamist pärast päeva PND 90 ja vajaduse korral lasta neil paarituda, et saada F_2-põlvkond. Samasse doosirühma kuuluvad isas- ja emasloomad pannakse kokku (vältides pesakonnakaaslaste kokku elama panemist) kuni kaheks nädalaks ajavahemikul PND 90–120. Katse korraldus on samasugune kui P-põlvkonna puhul. Olenevalt saadavatest tulemustest võib siiski olla piisav, kui lõpetada katse päeval PND 4 ja mitte jätkata katset kuni võõrutamiseni või kauem.

VAATLUSED KATSE LÕPETAMISEL

Kliiniline biokeemia ja hematoloogia

53. Süsteemset mõju tuleks jälgida P-põlvkonna loomade puhul. Katse lõpetamisel võetakse paastuvereproovid iga doosirühma kümnelt juhuvalikuga leitud P-põlvkonna isas- ja emasloomalt kindlaksmääratud kohast; proove säilitatakse asjakohastes tingimustes ning tehakse osaline või täielik hematoloogiline analüüs, kliinilis-biokeemiline analüüs, määratakse T4 ja TSH sisaldus või tehakse muud analüüsid, olenevalt uuritava kemikaali teadaolevast mõjuspektrist (vt OECD juhenddokument nr 151 (40)). Tuleks määrata järgmised hematoloogilised näitajad: hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja suhtarv, vereliistakute arv ning hüübimisaeg ja -võime. Vereplasmast või -seerumist tuleks määrata: glükoos, üldkolesterool, karbamiid, kreatiniin, üldvalk, albumiin ja vähemalt kaks hepatotsellulaarset mõju peegeldavat ensüümi (nt alaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, leelisene fosfataas, γ-glutamüültranspeptidaas ja sorbitooldehüdrogenaas). Täiendavate ensüümide ja sapihapete mõõtmine võib teatavatel asjaoludel anda kasulikku teavet. Lisaks võib võtta kõikide loomade vere ja säilitada hilisemaks analüüsiks, et aidata selgitada ebaselget mõju või saada laborisiseseid kokkupuudet

▼M5

käsitlevaid andmeid. Kui P-loomade teist paaritumist ei ole kavandatud, võetakse vereproovid vahetult enne ettenähtud surmamist või selle osana. Kui loomad jäetakse alles, kogutakse vereproovid paar päeva enne seda, kui loomad teist korda paaritatakse. Välja arvatud juhul, kui korduvdoosiuuringute andmed osutavad, et uuritav kemikaal ei mõjuta kõnealust näitajat, tuleks enne katse lõpetamist teha uriinianalüüs ja hinnata järgmised näitajad: uriini välimus, maht, osmolaalsus või erikaal, pH, valgusisaldus, glükoosisisaldus, vere ja vererakkude sisaldus, surnud rakud. Uriini võib koguda ka uuritava kemikaali ja/või metaboliitide eritumise jälgimiseks.

54. Süsteemset mõju tuleks jälgida ka F_1-põlvkonna loomade puhul. Katse lõpetamisel võetakse paastuvereproovid iga doosirühma kümnelt juhuvalikuga leitud kohort 1A isas- ja emasloomalt kindlaksmääratud kohast; proove säilitatakse asjakohastes tingimustes ning tehakse tavaline kliinilis-biokeemiline analüüs, sealjuures määratakse kilpnäärmehormoonide T4 ja TSH sisaldus, tehakse hematoloogiline analüüs (leukotsüütide üld- ja suhtarv ning erütrotsüütide arv) ja uriinianalüüsid.

55. Liigsetele poegadele tehakse päeval PND 4 täielik lahkamine ning kaaluda tuleks kilpnäärmehormooni (T4) sisalduse mõõtmist vereseerumis. Vajaduse korral võib vastsündinute (PND 4) vereproovid koondada pesakondade kaupa biokeemiliste ja kilpnäärmehormoonide analüüside tegemiseks. Hormoonide T4 ja TSH määramiseks kogutakse veri ka võõrutatud poegadelt, kellele tehakse täielik lahkamine päeval PND 22 (F_1-põlvkonna pojad, keda ei valitud kohortidesse).

Sperma näitajad

56. Sperma näitajad mõõdetakse kõikidel P-põlvkonna isasloomadel, kui 90-päevase katsega ei ole kindlaks tehtud, et uuritav kemikaal sperma näitajaid ei mõjuta. Sperma näitajad tuleks määrata kõikidel kohordi 1A isasloomadel.

57. Surmamisel registreeritakse kõikide P- ja F_1-põlvkonna (kohordi 1A) isasloomadel munandite ja munandimanuste mass. Vähemalt üks munand ja üks munandimanus säilitatakse histopatoloogiliseks uuringuks. Ülejäänud munandimanus kasutatakse munandimanuse sabas sisalduvate spermavarude määramiseks (16, 17). Lisaks kogutakse seemnerakkude kahjustamist vältivate meetoditega munandimanuse sabas või seemnejuhas olev sperma seemnerakkude liikuvuse ja morfoloogia hindamiseks (18).

58. Seemnerakkude liikuvust saab hinnata kohe pärast surmamist või hilisemaks analüüsiks säilitatud spermas. Liikumisvõimeliste seemnerakkude protsenti võib määrata subjektiivselt või objektiivselt liikumist analüüsiva arvutiprogrammiga (19, 20, 21, 22, 23, 24). Seemnerakkude morfoloogia hindamiseks tuleb munandimanusest (või seemnejuhast) võetud spermaproovi kõigepealt vaadelda fikseeritult või märgpreparaadis (25) ning iga proovi kohta vähemalt 200 spermatosoidi tuleb klassifitseerida kas normaalseks (nii pea kui ka keskosa/saba on normaalse välimusega) või ebanormaalseks. Sperma morfoloogiliste kõrvalekallete näideteks on kokkusulamine, isoleeritud pead ning peade ja/või sabade väärmoodustised (26). Väärmoodustistega või suure peaga seemnerakud võivad osutada spermatogeneesi häiretele.

59. Kui lahkamise ajal on spermaproovid külmutatud, äiged fikseeritud ja seemnerakkude liikuvuse analüüs salvestatud (27), võib edasisel analüüsil piirduda kontrollrühma ja suure doosi rühma isasloomadega. Kui täheldatakse kemikaali manustamisest tingitud mõjusid, tuleks siiski hinnata ka väiksema doosi rühmasid.

▼M5

Täielik lahang

60. Katse lõpetamisel või loomade enneaegse surma puhul lahatakse kõik P- ja F_1-põlvkonna loomad ning uuritakse makroskoopiliselt strukturaalsete kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Surmaeelses seisundis humaanselt surmatud või surnud pojad tuleks registreerida ja (kui nende laibad ei ole matsereerunud) nende laipu uurida võimalike puuete leidmiseks ja/või surmapõhjuse selgitamiseks; nende laibad tuleks säilitada.

61. Täiskasvanud P- ja F_1-põlvkonna emasloomadel uuritakse tupenõre äiet lahkamise päeval, et teha kindlaks innatsükli staadium ning leida korrelatsioonid suguelundite histopatoloogiaga. Kõikide P-emasloomade (ja F_1-põlvkonna emasloomade, kui see on kohaldatav) emakat uuritakse pesastumiskohtade olemasolu ja arvu määramiseks viisil, mis ei sega histopatoloogilist hindamist.

Elundite mass ja kudede säilitamine — täiskasvanud P- ja F_1-põlvkonna loomad

62. Katse lõpetamise ajal määratakse kõigi P-põlvkonna loomade ja kõigi täiskasvanud F_1-põlvkonna asjakohastesse kohortidesse (kirjeldatud allpool) kuuluvate loomade kehamass ja kõikide allpool loetletud organite märgmass nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Need organid tuleks säilitada sobivates tingimustes. Kui ei ole öeldud teisiti, võib paariselundid kaaluda eraldi või koos, vastavalt katset tegeva labori tavale.

— Emakas (koos munajuhade ja emakakaelaga, munasarjad);

— munandid, munandimanused (kokku ja munandimanuse sabad, mida kasutatakse seemnerakkude loendamiseks);

— eesnääre (dorsolateraalne ja ventraalne osa koos). Eesnäärmekompleksi puhastamisel naaberkudedest tuleb hoolikalt vältida vedelikuga täidetud seemnepõiekeste vigastamist. Kui eesnäärme üldmassi määramisel tuleb nentida käsitlemise mõju, tuleb eesnäärme dorsolateraalne ja ventraalne segment pärast fikseerimist hoolikalt välja lõigata ja kaaluda eraldi;

— seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmete ja nendes olevate vedelikega (tervikuna);

— aju, maks, neerud, süda, põrn, harkelund, ajuripats, kilpnääre (pärast fikseerimist), neerupealised ja teadaolevad sihtorganid või -koed.

63. Lisaks eespool loetletud elunditele tuleks võtta ja säilitada sobivates tingimustes järgmiste elundite proovid: perifeersed närvid, lihased, seljaaju, silmad ja nägemisnärv, seedetrakt, kusepõis, kopsud, hingetoru koos kilpnäärme ja kõrvalkilpnäärmetega, luuüdi, seemnejuha (isasloomad), rinnanäärmed (isas- ja emasloomad) ja tupp.

64. Määratakse kõigi kohordi 1A loomade elundite mass ja elundid konserveeritakse histopatoloogiliste uuringute jaoks.

65. Sünnieelselt ja -järgselt tekitatud immuuntoksiliste mõjude uurimiseks kasutatakse iga doosirühma kohordist 1A 10 isas- ja 10 emaslooma (1 isas- ja 1 emasloom pesakonna kohta; iga pesakonda esindab vähemalt 1 järglane; loomad on valitud juhuslikult), kellel pärast projekti lõpetamist:

— kaalutakse manustamisviisiga seotud lümfisõlmed ja kokkupuuteteest kaugemal asetsevad lümfisõlmed (lisaks neerupealiste, harkelundi ja põrna massi määramisele, mis on tehtud juba kõikidele kohort 1A loomadele);

▼M5

— tehakse põrna lümfotsüütide alampopulatsiooni analüüs (CD4+ ja CD8+ T-lümfotsüüdid, B-lümfotsüüdid ja looduslikud tapjarakud (NK-rakud); selleks kasutatakse pool põrna, teine pool põrna säilitatakse histopatoloogiliseks hindamiseks.

Immuniseerimata (kohordi 1A) loomade põrna lümfotsüütide alampopulatsioonide analüüsiga tehakse kindlaks, kas kokkupuude kemikaaliga on muutnud helperrakkude (CD4+) või tsütotoksiliste (CD8+) harkelundipäritoluga lümfotsüütide või looduslike tapjarakkude (NK-rakud) arvukust immunoloogilises püsiolekus (nimetatud rakud tagavad kiire reageerimise vähirakkudele ja haigusetekitajatele).

66. Kohort 1B loomadel tuleb kaaluda järgmised elundid ja töödelda asjaomased koed plokkpreparaatideks:

— tupp (kaalumata);

— emakas koos emakakaelaga;

— munasarjad;

— munandid (vähemalt üks);

— munandimanused;

— seemnepõiekesed koagulatsiooninäärmed;

— eesnääre;

— ajuripats;

— kindlakstehtud sihtorganid.

Kohordi 1B loomadele tehakse histopatoloogiline uuring, kui kohordi 1A tulemused on ebaselged või oletatakse reproduktiivtoksilisust või sisesekretsioonisüsteemi kahjustavaid omadusi.

67. Kohordid 2A ja 2B: arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katsed (PND 21–22 ja täiskasvanud järglased). Kohordi 2A loomad surmatakse pärast käitumuslikke katseid, määratakse aju mass ja tehakse täielik neurohistopatoloogiline analüüs neurotoksilisuse hindamiseks. Kohordi 2B loomad surmatakse päeval PND 21 või 22, määratakse aju mass ja tehakse aju mikroskoopiline läbivaatus neurotoksilisuse hindamiseks. Kohordi 2A puhul on vajalik fikseerimine perfusiooniga; kohordi 2B loomade puhul on see valikuline, nagu on ette nähtud katsemeetodis B.53 (35).

Elundite mass ja kudede säilitamine — F_1-põlvkonna võõrutuseas loomad

68. Pojad, keda ei ole valitud kohortidesse, seejuures kängujäänud pojad, surmatakse päeval PND 22, kui tulemused ei osuta täiendava elupuhuse uurimise vajadusele. Surmatud pojad lahatakse, mille käigus hinnatakse suguorganeid, nagu on kirjeldatud punktides 62 ja 63. Iga doosirühma kummastki soost kuni 10 pojal võimalikult paljudest pesakondadest määratakse aju, põrna ja harkelundi mass ja nimetatud elundid säilitatakse sobivates tingimustes. Lisaks sellele võib osutatud isastel ja emastel poegadel säilitada rinnanäärme koed hilisemaks mikroskoopiliseks analüüsiks ([1]) (vt OECD juhenddokument nr 151 (40)). Selgelt nähtavad väärarendid ja sihtkoed tuleks säilitada võimaliku histoloogilise uuringu jaoks.

([1]) Uuringud on näidanud, et rinnanääre, eriti varases nooruses toimuv rinnanäärme areng, on tundlik östrogeense toime näitaja. On soovitatav, et käesolevas katsemeetodis nähtaks ette noorte kummastki soost poegade rinnanäärmete uurimine pärast seda, kui see on valideeritud.

▼M5

Histopatoloogiline uuring — P-põlvkonna loomad

69. Kõikidel suure doosi ja kontrollrühmade P-põlvkonna loomadel tuleks teha kõikide punktides 62 ja 63 osutatud elundite täielik histopatoloogiline uuring. Kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutustega elundeid tuleks samuti uurida kõikidel väiksema doosiga rühmade loomadel, et määrata NOAEL (täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldav doos). Lisaks sellele tuleks loomadel, kellel kahtlustatakse vähenenud viljakust, nt nendel, kellel ei õnnestunud paarituda, viljastuda, sigitada või sünnitada terveid järglasi, või nendel, kelle innatsükkel või sperma hulk, liikuvus või morfoloogia olid muutunud, uurida suguelundeid ning kõiki suuremaid kahjustusi tuleks hinnata histopatoloogiliselt.

Histopatoloogiline uuring — F_1-põlvkonna loomad

Kohordi 1 loomad

70. Kõikidel suure doosi ja kontrollrühmade täiskasvanud kohordi 1A loomadel tuleks teha kõikide punktides 62 ja 63 osutatud elundite täielik histopatoloogiline uuring. Iga pesakonda peaks esindama vähemalt 1 järglane kummastki soost. Kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutuste ja nähtavate kahjustustega elundeid ja kudesid tuleks samuti uurida kõikidel väiksema doosi rühmade loomadel, et määrata NOAEL. Selleks, et hinnata sünnieelse ja -järgse kokkupuute põhjustatud mõjusid lümfisüsteemi organitele, tuleks samuti hinnata kogutud lümfisõlmede ja luuüdi histopatoloogiat kohordi 1A 10 isas- ja 10 emasloomal, lisaks kõikidel 1A-loomadel juba tehtavatele harkelundi, põrna ja neerupealiste histopatoloogilistele hindamistele.

71. Kohordi 1B kõikide loomade suguorganite ja sisesekretsiooninäärmete kudesid, mis on töödeldud plokkpreparaadiks, nagu on kirjeldatud punktis 66, tuleks uurida histopatoloogia suhtes juhtudel, kui kahtlustatakse reproduktiivtoksilist või sisesekretsioonisüsteemi kahjustavat mõju. Kohordi 1B loomadel tuleks teha ka histoloogiline uuring, kui kohordi 1A tulemused on ebaselged.

72. Täiskasvanud emasloomade munasarjad peaksid sisaldama esmaseid ja kasvavaid folliikuleid, samuti kollaskehi; seepärast tuleks F_1-emasloomadel püüda histopatoloogilise uurimisega kvantitatiivselt hinnata esmaseid ja väikseid kasvavaid munarakke, samuti kollaskehi; loomade arv, munasarjalõigete valik ja lõikeproovi suurus peaksid statistiliselt sobima kasutatava hindamisprotseduuriga. Folliikulite loendamise võib kõigepealt teha kontrollrühma ja suure doosi rühma loomadel, ning kui viimasel juhul leitakse kahjulikku mõju, siis uurida väiksema doosi rühmi. Uurimisel tuleks arvutada esmaste folliikulite arv, millele saab liita väikeste kasvavate folliikulite arvu, et võrrelda doosirühma ja kontrollrühma kuuluvate emasloomade munasarju (vt OECD juhenddokument 151 (40)). Kollaskehade hindamine peaks toimuma paralleelselt innatsükli staadiumi määramisega, nii et tsükli staadiumi saaks hindamisel arvesse võtta. Munajuhade, emaka ja tupe puhul uuritakse vastavale organile omast arengut.

73. F_1-isasloomadel uuritakse üksikasjalikult munandite histopatoloogiat, et teha kindlaks kemikaaliga kokkupuutest tingitud mõjud kudede diferentseerumisele munandis, munandi arengule ja spermatogeneesile (38). Võimaluse korral tuleks uurida *rete testis*'e lõikeid. Munandimanuse pead, keha ja saba ning seemnejuha uuritakse vastavale organile omase arengu suhtes, samuti uuritakse P-isasloomade puhul nõutavaid näitajaid.

▼M5

Kohordi 2 loomad

74. Pärast neurokäitumuslike katsete lõpetamist (pärast päeva PND 75, kuid mitte hiljem kui PND 90) tehakse kõikidele suure doosi ja kontrollrühmade kohordi 2A kummastki soost loomadele neurohistopatoloogilised uuringud. Aju histopatoloogiline uuring tehakse kõikidel suure doosi ja kontrollrühmadesse kuuluvatel kohordi 2B kummastki soost loomadel päeval PND 21 või 22. Kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutustega elundeid või kudesid tuleks samuti uurida väiksema doosi rühmade loomadel, et määrata NOAEL (täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldav doos). Kohortide 2A ja 2B loomade puhul uuritakse mitut aju lõiget, et uurida haistmissibulaid, ajukoort, hipokampi, basaalganglione, talamust, hüpotalamust, keskaju (*tectum*, *tegmentum* ja ajuvarred), ajutüve ja väikeaju. Ainult kohordi 2A puhul uuritakse silmi (võrkkest ja nägemisnärv) ja perifeersete närvide, lihaste ja seljaaju proove. Kõik neurohistoloogilised määramised tehakse kooskõlas katsemeetodiga B.53 (35).

75. Morfomeetrilised (kvantitatiivsed) hindamised tuleks teha aju tüüpilistes piirkondades (usaldusväärsete mikroskoopiliste märkide järgi valitakse hoolikalt homoloogsed lõiked) ning need hindamised võivad hõlmata konkreetsete ajupiirkondade joonmõõtmete või pindala mõõtmist. Iga iseloomuliku koha tasandilt võetakse vähemalt kolm järjestikust lõiget, et valida hindamiseks konkreetse ajuosa kõige homoloogsem ja tüüpilisem lõige. Neuropatoloogil peaks olema eksperdi otsustusvõimet, kui ta otsustab, kas mõõtmiseks valmistatud lõiked on homoloogsed muude lõigetega samade proovide hulgas ja kas neid seepärast on sobiv võtta võrdlemiseks, kuna eelkõige joonmõõtmed võivad muutuda juba väikse vahemaa juures (28). Mittehomoloogseid lõikeid ei tohiks kasutada. Kuigi eesmärk on võtta proovid kõigilt selleks ettenähtud loomadelt (10/sugu/doositase), võib piisata ka väiksemast arvust. Vähem kui 6 loomalt/sugu/doositase võetud proovidest tavaliselt siiski ei piisa käesoleva katsemeetodi puhul. Et tuvastada kemikaaliga kokkupuute mõju sellistele näitajatele nagu teatava neuroanatoomilise piirkonna maht või rakkude arv, võib kasutada stereoloogiat. Koenäidiste ettevalmistamisel tuleks kõikidel etappidel — kudede perfusioon, koeproovide väljalõikamine, kudede töötlemine ja mikroskoobipreparaatide värvimine — kasutada tasakaalustatud katsekorraldust, nii et igas partiis oleks iga doosirühma esindav valim. Kui kasutatakse morfomeetrilist või stereoloogilist analüüsi, tuleks kõikide doosirühmade ajukoed panna sobivasse fikseerivasse keskkonda samaaegselt, et vältida pikaajalisel fiksatiivis hoidmisel ajukoe kokkutõmbumisega seotud artefakte.

UURINGU PROTOKOLL

Andmed

76. Andmed esitatakse eraldi ja tabelisse kokkuvõetuna. Iga doosirühma ja iga põlvkonna kohta tuleks võimaluse korral teatada järgmised andmed: loomade arv katse alguses, katse ajal surnuna leitud või humaanselt surmatud loomade arv, iga looma surma või humaanse surmamise aeg, viljakate loomade arv, tiinete emasloomade arv, poeginud emasloomade arv, mürgistusnähtudega loomade arv. Tuleks teatada ka mürgistuse tunnuste kirjeldus, sealhulgas avaldumise aeg, kestus ja raskus.

77. Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata sobiva ja heakskiidetud statistilise meetodi abil; Statistilised meetodid tuleks valida juba uuringu kavandamisel ja nendega tuleks asjakohaselt arvesse võtta muid kui normaaljaotusega andmeid (nt loendusandmed), piiratud andmeid (nt piiratud vaatlusaeg), muudest andmetest sõltuvaid andmeid (nt pesakonna mõju, korduvad mõõtmised), ja ebavõrdset dispersiooni. Üldistatud lineaarsed

▼M5

segamudelid ning doosi ja toime vahelise sõltuvuse mudelid hõlmavad laia klassi analüütilisi vahendeid, mis võivad olla asjakohased käesoleva katsemeetodi alusel saadud andmete töötlemisel. Protokollis tuleb esitada piisavalt teavet analüüsimeetodi kohta ja kasutatud arvutiprogrammi kohta, nii et sõltumatu kontrollija/statistik võib hinnata ja uuesti hinnata analüüsi.

Tulemuste hindamine

78. Tulemusi tuleks hinnata täheldatud mõjude suhtes, kaasa arvatud lahanguja mikroskoopilised leiud. Hindamisega tehakse kindlaks, kas on olemas seos doosi ja kõrvalekallete, nende esinemissageduse ja raskusastme, sealhulgas silmaga täheldatavate kahjustuste vahel või sellist seost ei ole. Hinnata tuleb ka mõju sihtorganitele, viljakusele, kliinilistele kõrvalekalletele, paljunemiskäitumisele ja pesakonna eest hoolitsemisele, kehamassi muutusi, suremust ja muid mürgistusega seotud ja arengumõjusid. Erilist tähelepanu tuleks pöörata sooga seotud muutustele. Katsetulemuste hindamisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali füüsikalis-keemilisi omadusi ja võimaluse korral toksiko-kineetilisi andmeid, sh uuritava kemikaali läbipääsemist platsentast ja eritumist piimaga.

Katseprotokoll

79. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave, mis on saadud käesolevas uurimuses P-, F_1- ja F_2 -loomadega (vajaduse korral).

Uuritav kemikaal:

— kogu asjakohane kättesaadav teave uuritava kemikaali ja selle keemiliste, toksiko-kineetiliste ja toksikodünaamiliste omaduste kohta;

— tunnusandmed;

— puhtus.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valiku põhjendamine, kui kandeaine ei ole vesi.

Katseloomad:

— kasutatud liik/aretusliin;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, sööt, pesamaterjalid jne;

— iga looma mass katse alguses;

— P-emasloomade tupeäige andmed enne kemikaali manustamise algust (kui andmeid kogutakse sel ajal);

— P-põlvkonna isas- ja emasloomade paaritamise tulemused, näidatakse isas- ja emasloom ning paaritumise edukus;

— andmed F_1-põlvkonna täiskasvanud loomade pesakonnapäritolu kohta.

Katsetingimused:

— doositaseme valimise põhjendus;

— uuritava kemikaali valmistise/söödavalmistise üksikasjad, saavutatud kontsentratsioonid;

▼M5

— uuritava kemikaali stabiilsus kandeainega saadud valmistises, valmistise homogeensus (nt sööt, joogivesi), veres ja/või piimas kasutustingimustes ja säilitamisel eri kasutuskordade vahel;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— sööda/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) teisendus tegelikuks doosiks (mg kehamassi kg kohta päevas), vajaduse korral;

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda koostis, kui see on teada);

— poegade surmamiseks ja katserühmadesse määramiseks juhusliku valimise korra üksikasjalik kirjeldus;

— keskkonnatingimused;

— uuringust osavõtnute loetelu koos väljaõppe näitamisega.

Tulemused (kokkuvõte ja individuaalsed andmed sugude ja dooside kaupa):

— sööda tarbimine, vee tarbimine, kui see on teada, söödakasutuse tõhusus (kehamassi lisandumine tarbitud sööda grammi kohta, välja arvatud paaritamisperioodil ja imetamise ajal) ning uuritava kemikaali tarbimine (sööda või joogiveega manustamise puhul) P- ja F_1-põlvkonna loomade puhul;

— andmed omastamise kohta (kui on mõõdetud);

— P-loomade kehamassi andmed;

— valitud F_1-põlvkonna loomade võõrutusjärgsed kehamassi andmed;

— surmaaeg katse ajal või andmed loomade ellujäämise kohta kuni surmamiseni;

— kliiniliste leidude laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas kahjustused on pöörduvad või mitte);

— vereanalüüsi, uriinianalüüsi ja kliinilise keemia andmed, sealhulgas TSH ja T4;

— põrnarakkude fenotüübianalüüsi tulemused (T-, B-, NK-rakud);

— luuüdi rakuline koostis;

— mürgise toime andmed;

— P- ja F_1-põlvkonna emasloomade arv, kellel on normaalne või ebanormaalne innatsükkel ja tsükli kestus;

— aeg kuni paaritumiseni (koituseelne ajavahemik, päevade arv kokku paigutamise ja paaritumise vahel);

— toksilised või muud mõjud paljunemisele, sealhulgas selliste loomade arv ja osakaal, kellel toimus paaritumine, tiinestumine, sünnitamine ja imetamine; tiinuse esilekutsunud isasloomade arv ja osakaal, poegimisraskustega, pika või raske poegimisega emaste arv ja osakaal;

— tiinuse kestus ja, kui võimalik, poegimise kestus;

— pesastumiste arv, pesakonna suurus ja isasloomade protsent poegade hulgas;

— pärast pesastumist toimunud abortide, elussündide ja surnultsündinute arv ja protsent;

▼M5

— pesakonna ja poegade massi andmed (isased, emased ja koos), kängunud järglaste arv, kui see määrati;

— selgelt nähtavate arenguhälvetega poegade arv;

— mürgistuse või muud mõjud järglastele, sünnijärgsele kasvule, elujõulisusele jne;

— andmed poegade füüsilise arengu järkude kohta ja muud sünnijärgse arengu andmed;

— F_1-põlvkonna loomade suguküpsuse saabumise andmed;

— andmed poegade ja täiskasvanud loomade funktsionaalsete leidude kohta;

— andmed P- ja täiskasvanud F_1-põlvkonna loomade kehamassi kohta surmamisel ning elundite täieliku ja suhtelise massi kohta;

— lahkamise leiud;

— kõikide histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— P- ja F_1-põlvkonna isasloomade munandimanuse sabaosas olevate spermatosoidide koguarv, edasiliikuvate spermatosoidide protsent, morfoloogiliselt normaalsete spermatosoidide protsent ning tuvastatud kõrvalekaldega spermatosoidide protsent;

— P- ja F_1-põlvkonna emasloomade munasarjades olevate eri küpsemisstaadiumides folliikulite arvud, kui see on kohaldatav;

— F_1-põlvkonna emasloomade kollaskehade loendamise andmed;

— vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Kohordi 2 näitajad:

— üksikasjalik meetodi kirjeldus: kuidas standarditi tähelepanekud ja protseduurid, samuti märgatud nähtustele hindepunktide andmise tööjuhendid;

— kõikide katses kasutatud meetodite loetelu ja nende kasutamise põhjendused;

— kõikide kasutatud käitumuslike, funktsionaalsete, patoloogia-, neurokeemia- või elektrofüsioloogiameetodite üksikasjad, sealhulgas teave automaatseadmete kohta;

— seadmete kaliibrimise meetodid, seadmete samaväärsuse tagamine ja doosirühmade tasakaalustatud jaotamine katsete tegemisel;

— lühike selgitus kõigi otsuste kohta, milles kasutati eksperdihinnanguid;

— kõikide käitumisega seotud, funktsionaalsete, neuropatoloogiliste ja morfomeetriliste leidude üksikasjalik kirjeldus sugude kaupa, sealhulgas nii suurenemised kui ka vähenemised, võrreldes kontrollrühmadega;

— aju mass;

— neuroloogiliste tunnuste põhjal pandud diagnoosid ja oletatud kahjustused, sealhulgas looduslikult esinevad haigused või haigusseisundid;

— tüüpiliste leidude kujutised;

— madala lahutusvõimega kujutised, et oleks võimalik hinnata morfomeetriaks kasutatud lõigete homoloogsust;

▼M5

— tulemuste statistiline analüüs koos andmete analüüsiks kasutatud statistiliste mudelitega ja tulemused, sõltumata sellest, kas need olid olulised või mitte;

— muude toksiliste mõjude (sugude ja doosirühmade kaupa) seos uuritud kemikaali võimaliku neurotoksilisuse kohta tehtud järeldusega;

— toksiko-kineetilise teabe mõju järeldustele;

— andmed, mis kinnitavad katsemeetodi usaldusväärsust ja tundlikkust (st positiivsed ja varasemad kontrolli andmed);

— seosed neuropatoloogilise ja funktsionaalse mõju vahel, kui on seoseid;

— NOAEL või võrdlusdoos emaloomade ja järglaste puhul, sugude ja rühmade kaupa;

— tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav neurotoksiline aine, ja täheldatava kahjuliku toimeta doos.

Kohordi 3 näitajad:

— seerumi IgM-antikehade tiitrid (SRBC või KLH suhtes ülitundlikkuse tekkimine) või põrna IgM PFC ühikud (SRBC suhtes ülitundlikkuse tekkimine);

— T-rakkudest sõltuva antikehareaktsiooni katse (*T-cell dependant antibody response assay,* TDAR) korrektset läbiviimist tuleks kinnitada optimeerimise protsessi osana, kui labor teeb seda katset esimest korda, ja regulaarselt (nt igal aastal) kõikide laborite puhul;

— tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav immuuntoksiline aine, ja täheldatava kahjuliku toimeta doos.

Tulemuste arutelu.

Järeldused, sh NOAEL-väärtused mõjude kohta emadele ja järglastele

Samuti tuleks esitada kogu muu teave, mida ei saadud uuringu käigus, kuid mis abistab tulemuste tõlgendamist (nt mõju sarnasus muude teadaolevalt neurotoksiliste ainete mõjuga).

Tulemuste tõlgendamine

80. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring annab vajaduse korral teavet selle kohta, kuidas korduv kokkupuude kemikaaliga mõjutab reproduktiivtsükli kõiki etappe. Eelkõige annab uuring teavet reproduktiivsüsteemi ja järglaste arengu, kasvu, eluvõime ja funktsionaalsete näitajate kohta kuni päevani PND 90.

81. Tulemuste tõlgendamisel tuleb arvesse võtta kogu senist teavet uuritava kemikaali kohta, sealhulgas kemikaali füüsikalis-keemilisi, toksikokeemilisi ja -dünaamilisi omadusi, asjakohast teavet struktuurianaloogide ning varasemate mürgisuse uuringute kohta (nt äge mürgisus, korduvdoosi mürgisus, mehhaanilised uuringud ja uuringud, millega kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt hinnatakse *in vivo* ja *in vitro* metabolismi sõltuvust bioloogilisest liigist). Üldise lahangu ja elundite kaalumise tulemusi tuleks hinnata muudes, korduvate annustega uuringutes tehtud vaatluste kontekstis, kui see on teostatav. Järglaste kasvu vähenemist võib vaadelda seoses uuritava kemikaali mõjuga piima koostisele (29).

▼M5

Kohort 2 (arenguhäireid põhjustav neurotoksilisus)

82. Neurokäitumuslikke ja neuropatoloogilisi tulemusi tuleks tõlgendada kõikide tehtud tähelepanekute kontekstis, kasutades tõendite kaalukuse lähenemisviisi ja eksperdiarvamust. Arutada tuleks käitumuslike ja morfoloogiliste leidude tüüpe ning doosi ja toime vahelist sõltuvust. Kõnealuses arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse iseloomustuses tuleks hinnata inimeste epidemioloogilisi uuringuid või juhtumiaruandeid, katseloomade uuringuid (nt toksiko-kineetilisi andmeid, struktuuri-aktiivsuse sõltuvusi, muid toksikoloogiauuringute andmeid). Andmete hindamisel tuleks arutada nii bioloogilist kui ka statistilist tähtsust. Hindamisel tuleks vaadelda neuropatoloogiliste ja käitumuslike muutuste vahelist seost, kui täheldati mingeid muutusi. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse tulemuste tõlgendamise suunised vt katsemeetod B.53 (35) ja Tyl *et al*., 2008 (31).

Kohort 3 (arenguhäireid põhjustav immuuntoksilisus)

83. Immuunsüsteemi funktsiooni allasurumist või tugevdamist, mida mõõdetakse TDAR-meetodiga (T-rakkudest sõltuva antikehareaktsiooni katse), tuleks hinnata kõigi muude tähelepanekute kontekstis. TDAR-meetodi tulemuste olulisust võivad toetada muud immunoloogiaga seotud näitajad (nt luuüdi rakuline koostis, lümfikudede mass ja histopatoloogia, lümfotsüüdipopulatsioonide suhtarvud). TDAR-meetodiga kindlakstehtud mõju ei pruugi olla väga oluline, kui juba madalama doosiga kokkupuute juures esineb muid mürgistuse tunnuseid.

84. Reproduktiivtoksilisuse ja neurotoksilisuse tulemuste tõlgendamisel tuleks vaadata OECD juhenddokumenti nr 43 (26).

KIRJANDUS

1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69–98.

2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.

3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87–94.

5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.

6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.

7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.

▼**M5**

8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.

9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408–415.

10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84–97.

11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology*, 13: 383–390.

13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.

14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.

15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.

16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.

17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103–107.

18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*,5, 39–44.

19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.

20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.

21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409–421.

22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.

▼**M5**

23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319–333.

24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401–415.

25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.

26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330–337.

28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A "Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.

29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), „Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components", *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.

30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.

31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349–381.

32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

33) Käesoleva lisa peatükk B.43. Neurotoksilisuse uuring närilistel.

34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Paris.

35) Käesoleva lisa peatükk B.53. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuring.

36) Käesoleva lisa peatükk B.54. Uterotroofne biokatse närilistel: kiire sõelkatse östrogeensete omaduste väljaselgitamiseks.

37) Käesoleva lisa peatükk B.55. Hershbergeri biokatse rottidel: kiire sõelkatse (anti)androgeensete omaduste väljaselgitamiseks

▼**M5**

38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

1. liide

Mõõtmised ja vaatlused, mis kuuluvad funktsionaalvaatluste kompleksi (kohort 2A)

Kodupuur ja avamaa	Manipuleerimiskatsed	Füsioloogilised näitajad
Asend	Äravõtmise kergus	Temperatuur
Tahtmatud kloonilised ja toonilised krambid	Kättevõtmise kergus	Kehamass
Silmade sulgemine	Lihaste toonus	Pupilli reaktsioon
Turris karv	Reaktsioon lähenemisele	Pupilli suurus
Süljevool	Reaktsioon puudutusele	
Pisaravool	Helisignaalile reageerimine	
Häälitsused	Reaktsioon saba näpistamisele	
Järglaste hooldamine	Reaktsioon asendi muutmisele	
Kõnnaku kõrvalekalded	Tagajalgade laialiajamine kukutamisel	
Erutus	Esikäpa haardetugevus	
Stereotüüpne käitumine	Tagakäpa haardetugevus	
Kummaline käitumine		
Määrdumine		
Hingamise kõrvalekalded		

▼**M5**

2. liide

MÕISTED

Kemikaal – aine või segu.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M5

B.57. **H295R STEROIDOGENEESI KATSE**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 456 (2011). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid. OECD 2002. aasta kontseptuaalses raamistikus sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide katsetamiseks ja hindamiseks on viis taset; igale tasemele vastab erinev bioloogilise keerukuse tase (1). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vitro* H295R-*s*teroidogeneesi katses (H295R) on kasutatud inimese neerupealisevähi rakuliini (NCI-H295R-rakud) ja see vastab 2. taseme „*in vitro* katsele, millega saadakse mehhanistlike andmeid", mida kasutatakse sõelumiseks ja selleks, et tunnistada kemikaal erilist tähelepanu nõudvaks. Katse väljatöötamine ja standardimine sõelkatseks, mille abil saaks avastada kemikaalide poolt steroidogeneesile, eriti 17β-östradiooli (E2) and testosterooni (T) sünteesile avaldatavat mõju, toimus mitmeastmelise protsessina. H295R-katse on optimeeritud ja valideeritud (2, 3, 4, 5).

2. H295R steroidogeneesi katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis mõjutavad E2 ja T sünteesi. H295R-katse on ette nähtud selliste ksenobiootikute leidmiseks, mis mõjutavad raku endogeenseid komponente, millest koosneb kolesteroolist E2 ja/või T sünteesini viiv rakusisene biokeemiline sünteesirada. H295R-katse ei ole ette nähtud selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis mõjutavad steroidogeneesi hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) telje kaudu. Katse eesmärk on saada vastus JAH või EI küsimusele, kas kemikaal võib esile kutsuda või pärssida T ja E2 sünteesi; mõnel juhul võib saada aga ka kvantitatiivse tulemuse (vt punktid 53 ja 54). Katse tulemused väljendatakse hormoonide sünteesi suhteliste muutustena, võrreldes lahusti kontrolliga. Katse eesmärk ei ole saada konkreetset mehhanismi käsitlevat teavet, kuidas uuritav kemikaal mõjutab sisesekretsioonisüsteemi. Teadlased on uurinud kõnealuse rakuliini abil mõju konkreetsetele ensüümidele ja vahepealsete hormoonide nagu progesterooni sünteesile (2).

3. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud liites. Üksikasjalik katse-eeskiri, kuidas valmistada lahuseid, kasvatada rakke ja teha muid katse läbiviimiseks vajalikke töid, on esitatud OECD dokumendi 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' (4) I–III liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. Steroidsete suguhormoonide sünteesis osalevad viis ensüümi, mis katalüüsivad kuue steroidse suguhormooni biosünteesi. Kolesterooli ensümaatiline muundamine pregnenolooniks kolesterooli kõrvalahelat lõhustava tsütokroom P450 (CYP) ensüümi (CYP11A) poolt on steroidsete lõppsaadusteni viiva biokeemiliste reaktsioonide rea esimene etapp. Olenevalt kahe järgmise reaktsiooni järgust hargneb steroidogeenne rada kaheks rajaks, need on Δ^5-hüdroksüsteroidide rada ja Δ^4-ketosteroidide rada, mis ühinevad androsteendiooni sünteesi juures (joonis 1).

5. Androsteendioon muudetakse 17β-hüdroksüsteroiddehüdrogenaasi (17β-HSD) poolt testosterooniks (T). Testosteroon on nii vahesaadus kui ka lõpphormoonsaadus. Isaslooma organismis võib 5α-reduktaas muundada testosterooni (T) dihüdrotestosterooniks (DHT); 5α-reduktaasi leidub androgeenide sihtkudede, nagu eesnääre ja seemnepõiekesed, rakumembraanides, tuumaümbrises ja endoplasmaatilises retiikulumis. DHT on oluliselt tugevam androgeen kui T ja seda peetakse samuti lõpphormoonsaaduseks. H295R-katse abil ei mõõdeta DHT-d (vt punkt 10).

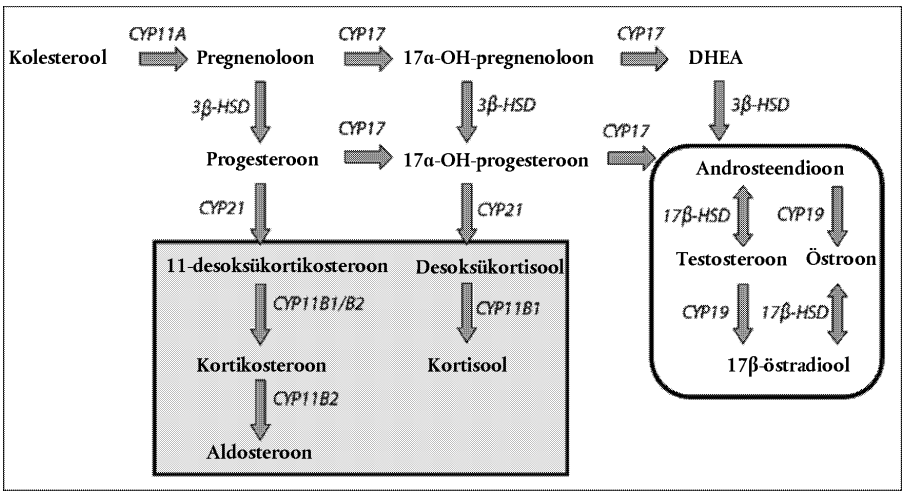
▼M5

6. Steroidogeense raja ensüüm, mis muundab androgeensed kemikaalid östrogeenseteks kemikaalideks, on aromataas (CYP19). CYP19 muundab testosterooni (T) 17β-östradiooliks (E2) ja androsteendiooni östrooniks. Hormoone E2 ja T peetakse steroidogeense raja lõppsaadusteks.

7. CYP17 lüaasse aktiivsuse spetsiifilisus vahepealsete substraatide suhtes oleneb loomaliigist. Inimesel eelistab see ensüüm Δ^5-hüdroksüsteroidse raja substraate (pregnenolooni), samal ajal kui roti puhul on eelistatud Δ^4-ketosteroidse raja substraadid (progesteroon) (19). Sellised erinevused CYP17 lüaasses aktiivsuses võivad selgitada mõningaid liigist sõltuvaid erinevusi *in vivo*-reaktsioonis steroidogeneesi mõjutavatele kemikaalidele (6). On näidatud, et H295R-rakud peegeldavad väga hästi täiskasvanud inimese neerupealise ensüümide ekspressiooni ja steroidide sünteesi (20), kuid nendes on ekspresseeritud androgeenide sünteesi nii Δ^5-hüdroksüsteroidse kui ka Δ^4-ketosteroidse raja ensüümid (7, 11, 13, 15).

Joonis 1

Steroidogeenne rada H295R-rakkudes



Märkus

Ensüümid on esitatud kaldkirjas, hormoonid on paksus kirjas ja nooled näitavad sünteesi suunda. Halli taustaga on näidatud kortikosteroidsed rajad ja saadused. Steroidsete suguhormoonide rajad ja saadused on ümbritsetud ringiga. CYP = tsütokroom P450; HSD = hüdroksüsteroiddehüdrogenaas; DHEA = dehüdroepiandrosteroon.

8. Inimese H295R-adrenokartsinoomi rakud on kasulik *in vitro* mudel steroidhormoonide sünteesile avaldatava mõju uurimiseks (2, 7, 8, 9, 10). H295R-rakkudes on ekspresseeritud geenid, milles on kodeeritud eespool steroidogeneesi jaoks olulised ensüümid (11, 15) (joonis 1). See on unikaalne omadus, kuna nende geenide *in vivo* ekspressioon sõltub koest ja arengustaadiumist; tavaliselt ei ole üheski koes ega üheski arengustaadiumis ekspresseeritud kõik steroidogeneesis osalevad geenid (2). H295R-rakkudel on inimloote tsonaalselt diferentseerumata neerupealiserakkude omadused (11). Need rakud kujutavad endast ainulaadset *in vitro*-süsteemi, kuna nad on suutelised sünteesima kõiki täiskasvanute neerupealise koores ja sugunäärmetes leiduvaid steroidhormoone ning see võimaldab uurida mõju nii kortikosteroidide sünteesile kui ka steroidsete suguhormoonide nagu androgeenide ja östrogeenide sünteesile, kui katse on valideeritud ainult T ja E2 määramiseks. Katsesüsteemiga kindlakstehtud T ja E2 sünteesi muutuste põhjuseks võivad olla uuritava kemikaali mitmesugused mõjud steroidogeensetele funktsioonidele, mis on ekspresseeritud H295R-rakkudes. Need hõlmavad mõju steroidhormoonide sünteesis, muundamises või kõrvaldamises osalevate ensüümide ekspressioonile, sünteesile või funktsioonidele (12, 13, 14). Hormoonide sünteesi pidurdamist võib põhjustada otsene

▼M5

konkurents sünteesiraja ensüümile sidumise pärast, mõju sellistele kofaktoritele nagu NADPH (nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat) ja cAMP (tsükliline adenosiinmonofosfaat) ja/või steroidide metabolismi kiirendamine või steroidogeneesi raja mõne ensüümi geeni ekspressiooni allasurumine. Kui sünteesi pidurdamist võib põhjustada hormoonisünteesis osalevate protsesside otsene või kaudne mõjutamine, siis sünteesi indutseerimine on tavaliselt seotud kaudse mõjuga, nagu kofaktorite (nt NADPH, cAMP) mõjutamine (see toimub forskoliini puhul), steroidide metabolismi vähendamine (13) ja/või steroidogeensete geenide ekspressiooni suurendamine.

9. H295R-katsel on rida eeliseid:

— see võimaldab kindlaks teha nii T ja E2 sünteesi suurenemist kui ka vähenemist;

— see võimaldab otse hinnata kemikaali võimalikku mõju raku eluvõimele või tsütotoksilisust. See on oluline, kuna see võimaldab eristada tsütotoksilisusest tingitud mõju sellisest mõjust, mis tuleneb kemikaalide otsesest toimest steroidogeensetele radadele; selline eristamine ei ole võimalik koeeksplantaatide korral, milles on palju eri tundlikkuse ja eri funktsioonidega rakutüüpe;

— meetod ei nõua loomade kasutamist;

— rakuliin H295R on kaubanduslikult kättesaadav.

10. Katsemeetodi peamised piirangud on järgmised:

— rakkude metaboliseerimisvõime ei ole teada, kuid on tõenäoliselt üsna piiratud; seepärast jäävad selle katsega tõenäoliselt avastamata kemikaalid, mida on vaja metabolismi kaudu aktiveerida;

— kuna H295R-rakud on saadud neerupealiste koest, on neis olemas ensüümid, mis võivad sünteesida glüko- ja mineraalkortikoide, samuti suguhormoone; seetõttu võib mõju glüko- ja mineraalkortikoidide sünteesile mõjutada katses täheldatavat T ja E2 taset;

— katsega ei saa määrata DHTd ja sellepärast ei saa määrata kemikaale, mis pidurdavad 5α-reduktaasi; sellisel juhul võib kasutada Hershbergeri katset (16);

— H295R-katsega ei saa avastada kemikaale, mis segavad steroidogeneesi hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS-) telje kaudu; seda omadust saab uurida ainult elusloomadel tehtavate katsetega.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis mõjutavad T ja E2 sünteesi. T on E2 sünteesi rajal ühtlasi üks vaheühendeid. Katsega saab kindlaks teha kemikaale, mis tavaliselt pidurdavad steroidogeneesi raja ensüüme.

▼M5

12. Katse tehakse tavaliselt standardse rakukultuuri tingimustes 24 süvendiga plaatidel. Katse tegemiseks võib kasutada ka muu suurusega plaate; sellisel juhul tuleb külvamist ja katsetingimusi siiski vastavalt kohandada, et järgida tulemuslikkuse kriteeriume.

13. Pärast 24-tunnilist kohanemisperioodi süvenditega plaatidel viiakse rakud 48 tunniks kokkupuutesse uuritava kemikaali seitsme kontsentratsiooniga (vähemalt kolm paralleelkatset). Paralleelselt tehakse katsed lahusti ja teada oleva pidurdaja või aktiveerija ühe kindla kontsentratsiooniga; need on negatiivne ja positiivne kontroll. Kokkupuuteperioodi lõpus eemaldatakse igast süvendist katsekeskkond. Rakkude elujõulisust igas süvendis kontrollitakse kohe pärast katsekeskkonna eemaldamist. Hormoonide keskmist kontsentratsiooni katsekeskkonnas saab mõõta eri meetoditega; võib kasutada müügil olevaid hormoonide mõõtmise komplekte ja/või kasutada instrumentaalseid meetodeid, näiteks vedelikkromatograafia-mass-spektromeetriat (LC-MS). Andmed väljendatakse suhtelise muutusena (kordades), võrreldes muutust lahusti kontrolli ja vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooniga (*lowest-observed-effect-concentration*, LOEC). Kui katse tulemus on negatiivne, teatatakse kõrgeim uuritud kontsentratsioon kui täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (*no-observed-effect-concentration*, NOEC). Järeldus kemikaali võime kohta mõjutada steroidogeneesi peaks põhinema vähemalt kahel teineteisest sõltumatul katsel. Esimese katse võib teha doosivahemiku otsimise katsena, edaspidi kohandatakse katsetes 2 ja 3 (kui need tehakse) kontsentratsioone, kui tekivad raskused lahustuvuse ja tsütotoksilisusega või kui kemikaali toime hakkab avalduma alles uuritud kontsentratsioonide vahemiku äärel.

RAKUKULTUURI KASVATAMINE

Rakuliin

14. NCI-H295R-rakke saab osta Ameerika rakukultuuride kollektsioonist (American Type Culture Collections, ATCC) materjali üleandmise lepingu (*Material Transfer Agreement*, MTA) ([1]) allakirjutamisel.

Sissejuhatus

15. Kuna rakkude võime toota E2 muutub rakkude vanuse või passaažide arvu suurenemisega (2), tuleks rakke enne nende kasutamist kasvatada teatavate eeskirjade järgi, ning üles tuleks märkida passaažide arv pärast rakkude ülessulatamist ja passaaži number, mille juures rakud külmutati ja pandi vedelasse lämmastikku. Esimene number on tegelik rakupassaaži number ja teine number näitab rakupassaaži, milles rakud külmutati ja pandi hoiule. Näiteks rakud, mis külmutati pärast viiendat passaaži ning sulatati ja seejärel eraldati aluselt kolm korda (4 passaaži, kui loeme värskelt sulatatud rakud passaažiks 1) pärast seda, kui neid oli jälle kasvatatud, saavad märgise 4.5. Nummerdamisskeemi kohta on esitatud näide valideerimisaruande I liites (4).

16. Säilituskeskkonda kasutatakse täiendatud keskkonna ja külmutamiskeskkonna alusena. Täiendatud keskkond on rakkude kasvatamise vajalik komponent. Külmutamiskeskkond on spetsiaalselt välja töötatud selleks, et rakke saaks kahjustamatult külmutada pikaajaliseks säilitamiseks. Enne kasutamist tuleks Nu-seerumit (vm sarnaste omadustega seerumit, mille kohta on näidatud, et see vastab katse tegemise ja kvaliteedikontrolli nõuetele), mis on lisatud keskkonna osa, analüüsida, et teha kindlaks T ja E2 taustkontsentratsioon. Nende lahuste valmistamist on kirjeldatud valideerimisaruande II liites (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA (http://www.lgcstandards-atcc.org/).

▼M5

17. Pärast H295R-rakkude kultuuri alustamist ATCC-originaalpartiist tuleb rakke kasvatada viie passaaži jooksul (st rakke eraldatakse aluselt 4 korda). Viienda passaaži rakud külmutatakse seejärel säilitamiseks vedelas lämmastikus. Enne rakkude külmutamist kasvatatakse eelmise, neljanda passaaži rakke kvaliteedikontrolli plaadil (vt punktid 36 ja 37), millega kontrollitakse, et hormoonide baasproduktsioon ja reageering positiivse kontrolli kemikaalidele vastaksid katse kvaliteedikontrolli kriteeriumidele, mis on esitatud tabelis 5.

18. H295R-rakke tuleb kasvatada, külmutada ja hoida vedelas lämmastikus selle tagamiseks, et alati on kättesaadavad vajaliku passaaži/vajalikus vanuses rakud kasvatamiseks ja kasutamiseks. H295R-katse puhul lubatav passaažide maksimaalne arv pärast uue ([1]) või külmutatud ([2]) rakupartii kultuuri võtmist ei tohiks olla üle 10. Näiteks sobivad rakukultuuride passaažid, mis on võetud 5. passaažis külmutatud partiist, on 4.5 kuni 10.5. Külmutatud partiist alustatud rakukultuuri puhul tuleb järgida punktis 19 kirjeldatud korda. Neid rakke tuleks kasvatada vähemalt neljas (4) täiendavas passaažis (passaaž 4.5), enne kui neid kasutatakse katses.

Rakkude võtmine külmutatud varukultuurist

19. Rakkude külmutatud varukultuurist võtmise korda tuleb kasutada siis, kui uus partii rakke võetakse välja vedela lämmastikuga hoidlast kasvatamiseks ja katses kasutamiseks. Toimimise üksikasjad on esitatud valideerimisuuringu III liites (4). Rakud eemaldatakse vedela lämmastikuga hoidlast, sulatatakse kiiresti, pannakse tsentrifuugitopsis olevasse täiendatud keskkonda, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas ja viiakse üle kultuurikolbi. Keskkonda tuleks järgmisel päeval vahetada. H295R-rakke kasvatatakse inkubaatoris 37 °C juures õhuatmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2, ja keskkonda uuendatakse 2–3 korda nädalas. Kui rakukultuur saavutab ligikaudu 85–90 % laatumise (konfluentsuse), tuleb kultuur eraldada aluselt. Rakkude aluselt eraldamine on vajalik nende tervise ja kasvu tagamiseks, et need oleksid biokatse tegemiseks vajalikus seisundis. Rakke loputatakse kolm korda fosfaatpuhvrit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca^{2+} ega Mg^{2+}) ja vabastatakse rakud kultuurikolvist, milleks lisatakse sobivat ensüümi, mis aitab rakkudel eralduda, nt trüpsiiniga fosfaatpuhvrit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca^{2+} ega Mg^{2+}). Kohe pärast rakkude eraldumist kultuurikolvist tuleks ensüümi toime peatada, milleks lisatakse kolm korda suurem kogus täiendatud keskkonda, kui selle lahuse maht, mida kasutati ensüümiga töötlemisel. Rakud viiakse üle tsentrifuugitopsi, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, supernatant eemaldatakse ja tsentrifuugitud rakukogum suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas. Sobiv kogus rakkudega lahust pannakse uude kultuurikolbi. Rakkudega lahuse kogus tuleks reguleerida selliseks, et rakud laatuvad 5–7 päevaga. Soovitatav alamkultuuri suhtarv on 1: 3 kuni 1: 4. Tass tuleks hoolikalt märgistada. Rakud on nüüd valmis katses kasutamiseks ja liigsed rakud tuleks külmutada vedelas lämmastikus, nagu on kirjeldatud punktis 20.

([1]) „Uus partii” — uus rakkude partii, mis on saadud ATCC-lt.
([2]) „Külmutatud partii” — rakke on varem kasvatatud ja siis külmutatud mujal kui ATCC-s.

▼M5

H295R-rakkude külmutamine (rakkude ettevalmistamine vedelas lämmastikus säilitamiseks)

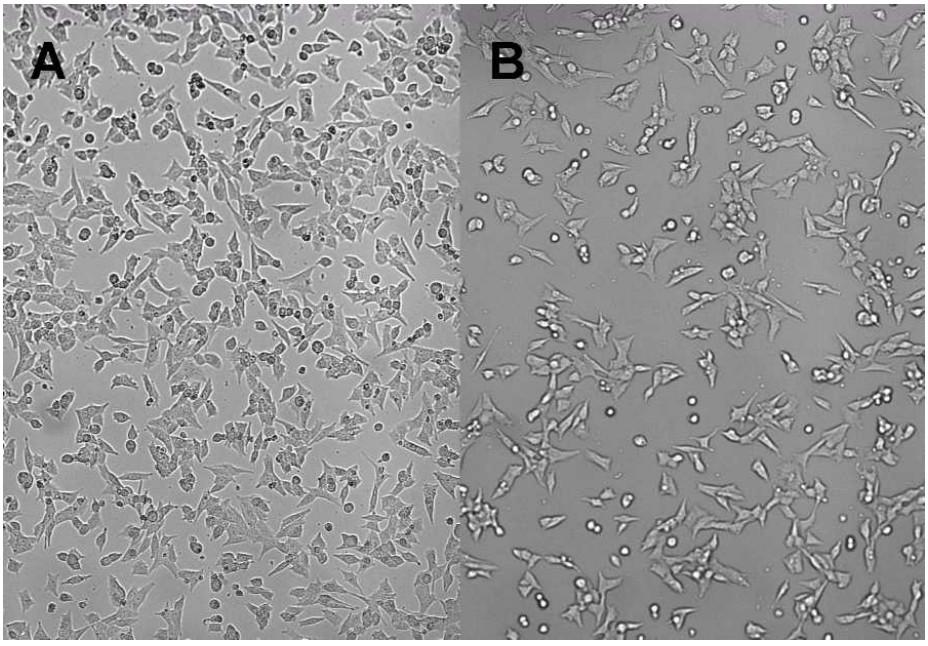
20. H295R-rakkude ettevalmistamisel külmutamiseks tuleks korrata eespool kirjeldatud rakkude eraldamisel kasutatud korda kuni tsentrifuugitopsi põhja kogutud rakkude uuesti suspendeerimiseni. Seekord suspendeeritakse tsentrifuugitud rakkudekogum külmutamiskeskkonnas. Rakkudega lahus viiakse üle krüoviaali, märgistatakse, nagu vaja, ja külmutatakse 24 tundi – 80 °C juures, mille järel viaal pannakse hoiule vedelasse lämmastikku. Toimimise üksikasjad on esitatud valideerimisuuringu III liites (4).

Rakkude kandmine plaadile ja eelinkubeerimine katse tegemiseks

21. Katse tegemiseks vajalike punktis 19 esitatud juhendite kohaselt ettevalmistatud 24 süvendiga plaatide arv sõltub uuritavate kemikaalide arvust ja rakkude laatumisest kultuuritassidel. Üldreeglina saab ühest kultuurikolvist (75 cm^2), milles laatumismäär on 80–90 %, piisava hulga rakke 1,5 (24 süvendiga) plaadi jaoks, kui vajalik rakkude tihedus on 200 000 kuni 300 000 rakku keskkonna ml-s, mis tekitab umbes 50–60 % laatumise süvendites 24 tunniga (joonis 2). See on tavaliselt sobivaim rakkude tihedus katses hormoonide sünteesiks. Suurema tiheduse juures muutub T ja ka E2 sünteesi ajaline käik. Enne katse esmakordset tegemist soovitatakse katsetada mitut külvamistihedust vahemikus 200 000 kuni 300 000 rakku ml-s ja edasisteks katseteks tuleks valida selline tihedus, mis annab 50–60 % laatumise süvendites 24 tunniga.

Joonis 2

H295R-rakkude mikrofoto külvamistihedusel 50 % 24 süvendiga plaadil pärast 24 tundi: A — süvendi äärel; B — süvendi keskel



22. Keskkond eemaldatakse kultuurikolvist pipetiga ja rakke loputatakse 3 korda steriilse fosfaatpuhvrit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca^{2+} ega Mg^{2+}). Lisatakse ensüümi lahust samas fosfaatpuhvrit sisaldavas soolalahuses, et eraldada rakud kultuurikolvist. Rakkude eraldumiseks sobiva aja järel tuleks ensüümi toime peatada, milleks lisatakse kolm korda suurem kogus täiendatud keskkonda, kui selle lahuse maht, mida kasutati ensüümiga töötlemisel. Rakud viiakse üle tsentrifuugitopsi, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, supernatant eemaldatakse ja tsentrifuugitud rakukogum suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas. Arvutatakse rakkude tihedus, kasutades näiteks hematotsütomeetrit või rakuloendajat. Rakkudega

▼M5

lahust tuleks lahjendada kuni vajaliku külvamistiheduseni ja segada hoolikalt, et tagada rakkude ühtlane tihedus. Rakud tuleks kanda plaadile, 1 ml rakkudega lahust igasse süvendisse, ning plaadid ja süvendid märgistatakse. Rakkudega plaate inkubeeritakse 24 tundi 37 °C juures õhuatmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2, et lasta rakkudel kinnituda süvenditele.

KVALITEEDIKONTROLLI NÕUDED

23. On väga oluline, et süvenditesse pandaks täpne maht lahuseid ja dooside lisamisel proove, kuna need mahud määravad kontsentratsioonid, mida kasutatakse katsetulemuste arvutamisel.

24. Enne rakukultuuri loomist ja edasist katsete tegemist peaks iga labor näitama, et tema hormoonide määramise süsteem on piisavalt tundlik (punktid 29–31).

25. Kui hormoonide määramiseks kasutatakse antikehapõhiseid katseid, tuleks enne katse alustamist kontrollida, kas uuritavad kemikaalid võivad segada T ja E2 mõõtmist vastavalt punktis 32 kirjeldatule.

26. Katse puhul soovitatakse lahustina kasutada dimetüülsulfoksiidi (DMSO). Kui kasutatakse muud lahustit, tuleks määrata:

— uuritava kemikaali, forskoliini ja prokloraasi lahustuvus selles lahustis ning

— tsütotoksilisus funktsioonina lahusti kontsentratsioonist.

Soovitatakse, et lahusti suurim lubatav kontsentratsioon ei oleks kõrgem kui solvendi madalaima tsütotoksilise kontsentratsiooni 10-kordne lahjendus.

27. Enne katse esmakordset tegemist peaks labor läbi tegema kvalifikatsioonikatse, mis näitab, et labor suudab hooldada rakukultuuri ning saavutada rakukultuuri ja eksperimenditingimused, mis on vajalikud kemikaali katsetamiseks, nagu on kirjeldatud punktides 33–35.

28. Katsete alustamisel uue partiiga tuleks enne uue partii rakkude kasutamist teha katse kontrollplaadiga, et hinnata rakkude toimimist, nagu on kirjeldatud punktides 36 ja 37.

Hormoonide määramise süsteemi toimimine

Meetodi tundlikkus, mõõtetäpsus ja kordustäpsus ning ristreaktsioonid proovi maatriksiga

29. Iga labor võib ise valida hormoonide mõõtmise süsteemi, mida ta kasutab H295R poolt sünteesitud T ja E2 määramiseks, tingimusel, et see vastab tulemuslikkuse kriteeriumidele, sealjuures mõõtmispiirile (*Limit of Quantification*, LOQ). Nominaalselt on need 100 pg/ml T puhul ja 10 pg/ml E2 puhul; väärtused põhinevad valideerimisuuringus leitud normaalsetel hormoonitaseme baasväärtustel. Kuid ka kõrgem või madalam tase võib olla sobiv; see oleneb hormoonide baastasemest, mis on määratud katset tegevas laboris. Enne edikontrolli plaadi ja uuritava kemikaali katsete käivitamist peaks labor tõendama, et kasutatava hormoonide määramise katsega saab hormoonide kontsentratsiooni mõõta täiendatud keskkonnas piisava mõõtmis- ja kordustäpsusega, et täita tabelites 1 ja 5 esitatud kvaliteedikontrolli kriteeriumid; selleks analüüsitakse täiendatud keskkonda, mida on tembitud hormooni sisestandardiga. Täiendatud keskkonda peaks olema

▼M5

tembitud kummagi hormooniga vähemalt kolmel kontsentratsioonil (nt 100, 500 ja 2 500 pg/ml T-d; 10, 50 ja 250 pg/ml E2; T ja E2-ga tempimise kõige madalama määrana võib kasutada ka kõige madalamaid võimalikke kontsentratsioone, arvestades valitud hormoonide määramise süsteemi avastamispiiri) ja need tuleks määrata. Ekstraheerimata proovides mõõdetud hormoonide kontsentratsioonid tohivad nominaalsest kontsentratsioonist erineda kuni 30 % ja sama proovi paralleelmõõtmiste erinevus ei tohiks olla üle 25 % (vt ka tabel 8, täiendavad kvaliteedikontrolli kriteeriumid). Kui need kvaliteedikontrolli kriteeriumid on täidetud, siis eeldatakse, et valitud hormoonide määramise süsteem on piisavalt täpne, korratav ja ei esine ristreaktsioone keskkonnaga (proovi maatriks), mis võiksid oluliselt mõjutada katse tulemust. Sellisel juhul ei ole enne hormoonide mõõtmist vaja proove ekstraheerida.

30. Kui tabelites 1 ja 8 esitatud kvaliteedikontrolli kriteeriumid ei ole täidetud, võib olla tegemist olulise maatriksiefektiga; sel juhul tuleb teha katse tembitud keskkonnaga ja ekstraheerida hormoonid. Ekstraheerimise käigu kohta on esitatud näide valideerimisaruande II liites (4). Hormoonide kontsentratsiooni mõõtmisel ekstraheeritud proovidest tuleks teha kolm paralleelkatset ([1]). Kui on võimalik näidata, et pärast ekstraheerimist keskkonna komponendid ei sega hormoonide määramise meetodit, nagu on määratletud kvaliteedikontrolli kriteeriumidega, tuleks kõik edaspidised katsed teha ekstraheeritud proovidega. Kui pärast ekstraheerimist ei õnnestu kvaliteedikontrolli kriteeriume täita, siis ei ole kasutatav hormoonide määramise süsteem sobiv H295R steroidogeneesi katses kasutamiseks ja tuleb kasutada muud hormoonide määramise meetodit.

Standardkõver

31. Lahusti kontrolli katsetest määratavad hormoonide kontsentratsioonid peaksid olema standardkõvera lineaarse osa peal. Eelistatavalt peaksid lahusti kontrolli tulemused asuma lineaarse osa keskel, mis tõendaks, et on võimalik mõõta nii hormoonisünteesi pärssimist kui ka aktiveerimist. Vastavalt sellele tuleks valida keskkonna (või ekstraktide) lahjendused, mis tehakse enne mõõtmist. Lineaarne sõltuvus määratakse kindlaks sobiva statistilise meetodiga.

Kemikaali häiriva mõju katse

32. Kui hormoonide määramiseks kasutatakse antikeha-põhiseid meetodeid nagu ensüümimmuunsorptsioonanalüüs (ELISA) ja radioimmuunanalüüs (RIA), tuleks enne kemikaalidega tegelike katsete tegemist kontrollida kemikaalide võimalikku segavat mõju (valideerimisaruande III liide (4)), kuna mõni kemikaal võib neid katseid segada (17). Kui esineb segamine, mis on ≥ 20 % hormoonide T ja/või E2 baastasemest, mis määratakse hormoonianalüüsiga, tuleb kõigi uuritavate kemikaalide varulahuse lahjendustega teha hormoonide analüüsile kemikaali poolt avaldatava segava mõju

([1]) *Märkus*: kui on vajalik ekstraheerimine, tehakse iga ekstraktiga kolm paralleelset määramist. Iga proovi ekstraheeritakse ainult üks kord.

▼M5

katse (nagu on kirjeldatud valideerimisaruande (4) III liites, jaotis 5.0), et teha kindlaks lävidoos, mille juures esineb oluline (≥ 20 %) segamine. Kui segamine on alla 30 %, võib segamise arvestamiseks viia tulemusse sisse parandi. Kui segamine on üle 30 %, on andmed kõlbmatud ja selliste kontsentratsioonide juures saadud andmed tuleks jätta arvestamata. Kui uuritav kemikaal segab oluliselt hormoonide määramist rohkem kui ühel kontsentratsioonil, mis ei ole tsütotoksiline, tuleb kasutada muud hormoonide määramise süsteemi. Selleks et vältida saastavate kemikaalide segavat mõju, on soovitatav hormoonid keskkonnast sobiva lahustiga ekstraheerida; võimalikud meetodid on esitatud valideerimisaruandes (4).

Tabel 1

Tulemuste õigsuse kriteeriumid hormoonide mõõtmise süsteemide puhul

Näitaja	Kriteerium
Mõõtmismeetodi tundlikkus	Mõõtmispiir T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml [a]
Hormoonide ekstraheerimise tõhusus (ainult siis, kui on vaja ekstraheerida)	Tembitud hormooniproovide keskmine ekstraheerimismäär (mis põhineb kolmel mõõtmisel) ei tohiks erineda üle 30 % lisatud kogusest.
Kemikaali segav mõju (ainult antikeha-põhised süsteemid)	Olulisi ristreaktsioone (> 30 % vastava hormooni baastasemest) ei ole ühegi raku poolt sünteesitava hormooniga [b] [c].

[a] *Märkus:* meetodi mõõtmispiirid põhinevad tabelis 5 esitatud hormoonide sünteesi baastaseme väärtustel ja sõltuvad määramise kvaliteedist. Kui saavutatakse kõrgem hormoonide baastase, võib piir olla kõrgem.

[b] Mõned T ja E2 antikehad võivad suurema protsendimäära korral ristreageerida vastavalt androsteendiooni ja östrooniga. Sellisel juhul ei ole võimalik õigesti määrata mõju 17β-hüdroksüsteroiddehüdrogenaasile. Siiski võib andmetest saada kasulikku teavet mõju kohta üldisele östrogeenide või androgeenide sünteesile. Sellistel juhtudel tuleks andmed väljendada pigem androgeeni/östrogeeni toimena, mitte E2 ja T-na.

[c] Need hõlmavad järgmisi: kolesterool, pregnenoloon, progesteroon, 11-desoksükortikosteroon, kortikosteroon, aldosteroon, 17α-pregnenoloon, 17α-progesteroon, desoksükortisool, kortisool, DHEA, androsteendioon, östroon.

Labori pädevuse katse

33. Enne tundmatu kemikaali katsetamist peaks labor näitama, et ta suudab saavutada ja säilitada asjakohast rakukultuuri ja katsetingimusi, mis on vajalikud katse edukaks läbiviimiseks; selleks tehakse labori pädevuse katse. Kuna katse tulemuslikkus sõltub otseselt laboris analüüsi tegevatest inimestest, tuleb neid katseid osaliselt korrata, kui labori töötajaskonnas on muutusi.

34. Labori pädevuse katse tehakse samades tingimustes, mis on loetletud punktides 38–40: rakud viiakse kokkupuutesse tugeva, mõõduka ja nõrga aktivaatori ja pärssija 7 kontsentratsiooniga ja negatiivse kemikaaliga (vt tabel 2). Konkreetselt kuuluvad uuritavate ainete hulka järgmised kemikaalid: tugev aktivaator forskoliin (CASi nr 66575-29-9); tugev pärssija prokloraas (CASi nr 67747-09-5); mõõdukas aktivaator atrasiin (CASi nr 1912-24-9); mõõdukas pärssija aminoglutetimiid (CASi nr 125-84-8); nõrk (E2 sünteesi)

▼M5

aktivaator ja nõrk (T sünteesi) pärssija bisfenool A (CASi nr 80-05-7) ning negatiivne kemikaal inimese kooriongonadotropiin (HCG) (CASi nr 9002-61-3), vt tabel 2. Eraldi plaatidel tehakse katsed kõigi kemikaalidega, kasutades tabelis 6 näidatud formaati. Iga päev tuleb koos katsetega teha ka üks katse kvaliteedikontrolli plaadiga (tabel 4, punktid 36-37), millele pannakse labori pädevuse kontrollimise kemikaalid.

Tabel 2

Pädevuse kontrollimise kemikaalid ja kokkupuutekontsentratsioonid

Pädevuse kontrollimise kemikaal	Uuritavad kontsentratsioonid [μM]
prokloraas	0 (a), 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1, 3, 10
forskoliin	0 (a), 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3, 10, 30
atrasiin	0 (a), 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
aminoglutetimiid	0 (a), 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
bisfenool A	0 (a), 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
HCG	0 (a), 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100

(a) Lahusti (DMSO) kontroll (0), 1 μl DMSOd süvendisse.

H295R kokkupuude pädevuse kontrollimise kemikaalidega tuleks teha 24 süvendiga plaatidel labori pädevuse kontrollimise katse ajal. Doosi ühik kõigi uuritavate kemikaalide puhul on μM. Doosid tuleks manustada DMSO-lahusena, 0,1 mahuprotsenti igasse süvendisse. Iga uuritavat kontsentratsiooni tuleks katsetada kolmes süvendis (tabel 6). Iga kemikaali uuritakse eraldi plaadil. Iga päev lisatakse plaatide hulka üks kvaliteedikontrolli plaat.

35. Rakkude elujõulisuse ja hormoonide analüüsid tuleb teha vastavalt punktidele 42–46. Teatatakse läviväärtus (vähim avastatava mõjuga kontsentratsioon, *lowest observed effect concentration*, LOEC) ja otsus klassifitseerimise kohta ning tulemusi võrreldakse tabelis 3 esitatud väärtustega. Andmed loetakse kasutamiskõlblikuks, kui need vastavad LOEC-le ja klassifitseerimisotsusele, mis on esitatud tabelis 3.

Tabel 3

Läviväärtused (LOEC) ja klassifitseerimisotsused pädevuse kontrollimise kemikaalide puhul

	CASi number	LOEC [μM]		Klassifitseerimisotsus	
		T	E2	T	E2
prokloraas	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ (a) (Pärssimine)	+ (pärssimine)
forskoliin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (aktiveerimine)	+ (aktiveerimine)
atrasiin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (aktiveerimine)	+ (aktiveerimine)
aminoglutetimiid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (pärssimine)	+ (pärssimine)

▼M5

	CASi number	LOEC [µM]		Klassifitseerimisotsus	
		T	E2	T	E2
bisfenool A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (pärssimine)	+ (aktiveerimine)
HCG	9002-61-3	Puudub	Puudub	Negatiivne	Negatiivne

(a) +, positiivne
Puudub: ei kohaldata, kuna pärast kokkupuudet negatiivse kontrolli mittetsütotoksilise kontsentratsiooniga ei tohiks muutusi olla.

Kvaliteedikontrolli plaat

36. Kvaliteedikontrolli plaati kasutatakse H295R-rakkude toimimise tõendamiseks rakkude kasvatamise standardtingimustes ja varasemate katsete andmebaasi loomiseks, millesse pannakse hormoonide kontsentratsioon lahusti kontrolli katsetes, positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes, samuti varasemate katsete muud kvaliteedikontrolli peegeldavad näitajad.

— H295R-rakkude toimimist tuleks hinnata nii, et kvaliteedikontrolli plaadiga kontrollitakse iga uut ATCC partiid, samuti varem külmutatud rakkude iga sulatatud partiid, kui sama rakkude partiiga ei tehta labori pädevuse katset (punktid 32–34).

— Üks kvaliteedikontrolli plaat võimaldab täielikult hinnata katse tingimusi (nt rakkude elujõulisus, lahusti kontrollid, negatiivsed ja positiivsed kontrollid, samuti katsetevaheline ja katsesisene varieeruvus) kemikaali katsetamisel ning see peaks kuuluma iga katse juurde.

37. Kvaliteedikontrolli katse tehakse 24 süvendiga plaadil ja selle puhul kasutatakse samasugust inkubeerimise, dooside manustamise, rakkude eluvõimelisuse või tsütotoksilisuse määramise, hormoonide ekstraheerimise ja analüüsimise korda, mida on kirjeldatud punktides 38–46 kemikaalide katsetamiseks. Kvaliteedikontrolli plaadil on tühikatsed, lahusti kontrollid ning E2 ja T teadaoleva aktivaatori kaks kontsentratsiooni (forskoliin, 1 ja 10 µM) ning teadaoleva pärssija kaks kontsentratsiooni (prokloraas, 0,1 ja 1 µM). Lisaks kasutatakse MeOH teatavates süvendites kui rakkude eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse positiivset kontrolli. Plaadi üksikasjalik kirjeldus on esitatud tabelis 4. Kriteeriumid, millele peavad vastama kvaliteedikontrolli plaadi tulemused, on loetletud tabelis 5. Nii lahusti kontrolli kui ka tühikatsete süvendites tuleb saavutada T ja E2 sünteesi minimaalne baastase.

Tabel 4

Kvaliteedikontrolli plaat, millega kontrollitakse mõjutamata H295R-rakkude ja teadaolevate pärssijatega (PRO — prokloraas) ja aktiveerijate (FOR — forskoliin) kokkupuutes olevate H295R-rakkude E2 ja T sünteesi. Pärast kokkupuutekatse lõpetamist ja keskkonna kõrvaldamist lisatakse kõikidesse MeOH süvenditesse 70 % metanoolilahust; see on tsütotoksilisuse positiivne kontroll (vt tsütotoksilisuse katse valideerimisaruande (4) III liites)

	1	2	3	4	5	6
A	Tühikatse (a)	Tühikatse (a)	Tühikatse (a)	Tühikatse (a) (+ MeOH) (b)	Tühikatse (a) (+ MeOH) (b)	Tühikatse (a) (+ MeOH) (b)
B	DMSO (c) 1 µl	DMSO (c) 1 µl	DMSO (c) 1 µl	DMSO (c) 1 µl (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1 µl (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1 µl (+ MeOH) (b)

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

([a]) Tühikatse süvendites olevatele rakkudele lisatakse ainult keskkonda (st lahustit ei lisata).
([b]) Metanool (MeOH) lisatakse pärast seda, kui kokkupuude on lõpetatud ja keskkond on nendest süvenditest eemaldatud.
([c]) DMSO lahusti kontrolli katse (1 μl süvendi kohta).

Tabel 5

Kvaliteedikontrolli plaadi tulemuslikkuse kriteeriumid

	T	E2
Hormoonide baassüntees lahusti kontrollis (SC)	≥ 5 korda LOQ	≥ 2,5 korda LOQ
Aktiveerimine (10 μM forskoliin)	≥ 1,5 korda SC	≥ 7,5 korda SC
Pärssimine (1μM prokloraas)	≥ 0,5 korda SC	≥ 0,5 korda SC

KEMIKAALIGA KOKKUPUUTESSE VIIMINE

38. Eelinkubeeritud rakud võetakse inkubaatorist välja (punkt 21) ja kontrollitakse mikroskoobi all, et teha kindlaks, kas need on heas seisundis (kleepumine, morfoloogia) enne kemikaaliga kokkupuutesse viimist.

39. Rakud pannakse bioohutuskambrisse ja eemaldatakse täiendatud keskkond ning asendatakse uue täiendatud keskkonnaga (1 ml süvendi kohta). Käesoleva katsemeetodi puhul on eelistatud lahusti DMSO. Kui on olemas põhjusi muude lahustite kasutamiseks, tuleks esitada teaduslik põhjendus. Rakud viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse, milleks lisatakse 1 μl sobivat põhilahust dimetüülsulfoksiidis (vt valideerimisaruande (4) II liide) süvendis oleva täiendatud keskkonna 1 ml kohta (süvendi maht). Sellega saavutatakse süvendites DMSO lõppkontsentratsioon 0,1 %. Vajaliku segamise kindlustamiseks eelistatakse üldiselt segada uuritava kemikaali sobiv põhilahus DMSOs täiendatud keskkonnaga, et saada iga doosi vajalik lõppkontsentratsioon, ja selline segu lisatakse igasse süvendisse kohe pärast vana keskkonna eemaldamist. Kui kasutatakse sellist varianti, peaks DMSO kontsentratsioon (0,1 %) olema ühesugune kõikides süvendites. Süvendeid, milles on kaks kõige kõrgemat kontsentratsiooni, kontrollitakse visuaalselt stereomikroskoobiga, et neis ei oleks sadet ega hägu, mis osutaks kemikaali ebapiisavale lahustuvusele. Kui leitakse hägusust või sademe tekkimist, kontrollitakse ka järgmise kahe kontsentratsiooniga süvendeid (jne); kontsentratsioone, mille juures ei saavutatud täielikku lahustumist, ei arvestata edasisel hindamisel ja analüüsil. Plaat pannakse tagasi inkubaatorisse 37 °C juurde 5 % CO_2-sisaldusega õhu atmosfääri 48 tunniks. Uuritava kemikaaliga katse plaat on näidatud tabelis 6. Põhilahused 1–7 näitavad uuritava kemikaali suurenevate dooside paigutust.

▼M5

Tabel 6

Dooside manustamise skeem H295R-rakkude kokkupuutel uuritava kemikaaliga 24-süvendilisel plaadil

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Põhilahus 4	Põhilahus 4	Põhilahus 4
B	Põhilahus 1	Põhilahus 1	Põhilahus 1	Põhilahus 5	Põhilahus 5	Põhilahus 5
C	Põhilahus 2	Põhilahus 2	Põhilahus 2	Põhilahus 6	Põhilahus 6	Põhilahus 6
D	Põhilahus 3	Põhilahus 3	Põhilahus 3	Põhilahus 7	Põhilahus 7	Põhilahus 7

40. Pärast 48-tunnilist kokkupuudet võetakse plaadid inkubaatorist ja iga süvendit kontrollitakse mikroskoobiga rakkude seisundi (kleepumine, morfoloogia, laatumise määr) ja tsütotoksikoloogilisuse suhtes. Iga süvendi keskkond jagatakse kaheks võrdseks osaks (kumbki ligikaudu 490 µl) ja kantakse kahte korralikult märgistatud viaali (st üks alikvoot annab iga süvendi kohta varuproovi). Rakkude kuivamise vältimiseks eemaldatakse keskkond korraga ühe rea süvenditest ja asendatakse keskkonnaga rakkude eluvõimelisuse (tsütotoksilisuse) katseks. Kui rakkude eluvõimelisust (tsütotoksilisust) kohe määrama ei hakata, lisatakse igasse süvendisse 200 µl fosfaatpuhvrit sisaldavat soolalahust, mis sisaldab Ca^{2+} ja Mg^{2+}. Keskkond külmutatakse – 80 °C juures kuni edasise töötlemiseni hormoonikontsentratsioonide määramiseks (vt punktid 44–46). T ja E2 on – 80 °C juures hoitavas keskkonnas üldiselt stabiilsed vähemalt kolm kuud, kuid hormoonide stabiilsus säilitamisel tuleks dokumentaalselt tõendada igas laboris.

41. Kohe pärast keskkonna eemaldamist määratakse igal kemikaaliga kokkupuute plaadil rakkude eluvõimelisus/tsütotoksilisus.

Rakkude eluvõimelisuse määramine

42. Rakkude eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katset võib teha mitmel viisil; katse eesmärk on teha kindlaks kemikaali võimalik mõju rakkude eluvõimele. Katsega peaks saama määrata süvendis olevate eluvõimeliste rakkude tegelikku protsendimäära või tuleb näidata, et see on võrreldav katsega Live/-Dead® (on selle lineaarne funktsioon) (vt valideerimisaruande (4) III liide). Samavõrra hästi töötab teine katse MTT-ga ([3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid] (18)). Rakkude eluvõimelisuse hindamine nimetatud meetoditega on suhteline ja selle puhul ei pruugi tingimata olla lineaarset sõltuvust süvendis olevate rakkude absoluutsest arvust. Seepärast tuleks igas süvendis rakke paralleelselt hinnata ka silmaga ning teha lahusti kontrolli ja kahe kõrgeima mittetsütotoksilise kontsentratsiooni katse digitaalpildid arhiivi jaoks, et hiljem oleks võimalik määrata tegelikku rakkude tihedust, kui seda on vaja. Kui visuaalne kontrollimine või eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katse näitab rakkude arvu suurenemist, tuleb seda näilist kasvu kontrollida. Kui rakkude arvu suurenemist kontrollitakse, tuleks see märkida katseprotokolli. Rakkude eluvõimelisus väljendatakse suhtena lahusti kontrolli katsete keskmisse tulemusse; viimast peetakse 100 % eluvõimelisuseks ja see arvutatakse vastavalt kasutatava rakkude eluvõimelisuse/tsütoloogilisuse katse eeskirjale. MTT-katse puhul võib kasutada järgmist valemit:

▼M5

eluvõimeliste rakkude % = (väärtus süvendis – MeOH-ga [= 100 % surnud] süvendite keskväärtus) ÷ (lahustikontrolli süvendite keskväärtus – MeOH-ga [= 100 % surnud] süvendite keskväärtus)

43. Süvendid, milles eluvõimelisus on alla 80 % võrreldes keskmise eluvõimelisusega lahusti kontrolli katsetes (= 100 % eluvõimelisus), tuleks lõplikust andmete analüüsist välja jätta. Kui steroidogeneesi pärssimine toimub peaaegu 20-protsendilise tsütotoksilisuse juures, tuleb tulemust hoolikalt hinnata ja tõendada, et pärssimise põhjuseks ei ole tsütotoksilisus.

Hormoonide analüüs

44. Iga labor võib kasutada vabalt valitud süsteemi hormoonide T ja E2 mõõtmiseks. Iga doosirühma vabasid keskkonna alikvoote võib kasutada lahjenduste tegemiseks, et viia kontsentratsioon standardkõvera lineaarsesse osasse. Nagu märgitud punktis 29, peaks iga labor tõendama, et tema hormoonide määramise süsteem (nt ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) vastab kvaliteedikontrolli kriteeriumidele. Selle jaoks tuleb enne kvaliteedikontrolli katseid või kemikaalide katsetamist täiendatud keskkonda tempida hormooni sisestandardiga. Selleks et tagada, et katsesüsteemi komponendid ei segaks hormoonide määramist, võib olla vajalik need enne määramist keskkonnast ekstraheerida (vt punkt 30, millistel tingimustel ekstraheerimine on või ei ole vajalik). On soovitatav teha ekstraheerimine nii, nagu on kirjeldatud valideerimisaruande (4) III liites.

45. Kui hormoonide sünteesi mõõdetakse kaubandusliku katsekomplektiga, tuleb hormoonide analüüs teha vastavalt katsekomplekti tootja juhenditele. Enamikul tootjatest on oma individuaalne meetod hormoonide analüüsi tegemiseks. Uuritavaid proove on vaja lahjendada nii, et eeldatavad hormoonide kontsentratsioonid lahusti kontrolli katsetes langevad üksikkatse standardkõveral lineaarse osa keskele (valideerimisaruande (4) III liide). Väärtused väljaspool standardkõvera lineaarset osa tuleb jätta arvestamata.

46. Lõplik hormoonide kontsentratsioon arvutatakse järgmiselt.

Näide:

Ekstraheeriti:	450 µl keskkonda
Lahustati:	250 µl katsepuhvris
Lahjendus analüüsiks:	1: 10 (proovi tulemuse toomiseks standardkõvera lineaarsesse osasse)
Hormooni kontsentratsioon mõõdetud proovis:	150 pg/ml (pärast kohandamist kontsentratsiooniks mõõdetud proovi milliliitris)
Taas leitud:	89 %
Lõplik hormooni kontsentratsioon =	(hormooni kontsentratsioon (milliliitri kohta) ÷ taas leitud) (lahjendustegur)
Lõplik hormooni kontsentratsioon =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Uuritavate kontsentratsioonide valimine

47. Tuleks teha vähemalt kaks sõltumatut analüüsikatset. Kui katses kasutatavate kontsentratsioonide valimiseks ei ole varasemast teavet lahustuvuspiiride või tsütotoksilisuse kohta, siis soovitatakse esimesel katsel võtta katsekontsentratsioonid vahega $\log_{10}$, kusjuures 10^{-3} M on maksimaalne kontsentratsioon. Kui kemikaal on lahustuv ja ei ole tsütotoksiline ühelgi uuritud kontsentratsioonil ning esimesel katsel andsid kõik kontsentratsioonid negatiivse tulemuse, siis tuleb seda kinnitada veel ühe katsega, kasutades samu tingimusi kui esimesel katsel (tabel 7). Kui esimese katse tulemused on *ebaselged* (st suuruse suhteline muutus (kordades) on lahusti kontrolliga võrreldes statistiliselt oluline ainult ühel kontsentratsioonil) või positiivsed (st suuruse suhteline muutus lahusti kontrolliga võrreldes on statistiliselt oluline kahe või enama kõrvuti oleva kontsentratsiooni puhul), tuleb katset korrata, nagu on näidatud tabelis 7, täpsustades katseks kontsentratsioonide valimist. Uuritavaid kontsentratsioone teises ja kolmandas katses (kui see tehakse) tuleks kohandada, arvestades esimeses katses mõju põhjustanud kontsentratsioonivahemikku, kasutades poole logaritmilise ühiku suurusi kontsentratsioonivahemikke (nt kui esimeses katses kontsentratsioonidega 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 µM leiti aktivatsioon kontsentratsioonidel 1 ja 10 µM, tuleks teises katses valida kontsentratsioonideks 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 µM), kui ei ole vaja kasutada väiksemaid kontsentratsioone LOEC saavutamiseks. Viimasel juhul kasutatakse vähemalt viit kontsentratsiooni allpool madalaimat esimeses katses uuritud kontsentratsiooni poole logaritmilise ühiku suuruse vahega. Kui teine katse ei kinnita esimest katset (st statistiliselt olulist erinevust ei leita varem positiivse kontsentratsiooni ümbruses ±1 kontsentratsiooniinkrement), tuleb teha kolmas katse, kasutades esialgseid katsetingimusi. Esimese katse ebaselged tulemused loetakse negatiivseks, kui täheldatud mõju ei õnnestu kinnitada ühegagi järgmisest kahest katsest. Ebaselged tulemused loetakse positiivseks toimeks, kui reaktsiooni õnnestub kinnitada vähemalt ühes järgmises katses kontsentratsioonil ±1 kontsentratsiooniinkrement (vt punkt 55, andmete tõlgendamise meetod).

Tabel 7

Otsuste maatriks võimalike tulemusestsenaariumide korral

1. katse	2. katse		3. katse		Otsus	
Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Positiivne	Negatiivne
Negatiivne	Kinnita ([a])	Negatiivne	Stopp			X
Negatiivne	Kinnita ([a])	Positiivne	Täpsusta ([b])	Negatiivne		X
Ebaselge ([c])	Täpsusta ([b])	Negatiivne	Kinnita ([a])	Negatiivne		X
Ebaselge ([c])	Täpsusta ([b])	Negatiivne	Kinnita ([a])	Positiivne	X	
Ebaselge ([c])	Täpsusta ([b])	Positiivne			X	
Positiivne	Täpsusta ([b])	Negatiivne	Kinnita ([a])	Positiivne	X	

▼M5

1. katse	2. katse		3. katse		Otsus	
Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Positiivne	Negatiivne
Negatiivne	Kinnita ([a])	Positiivne	Täpsusta ([b])	Positiivne	X	
Positiivne	Täpsusta ([b])	Positiivne	Stopp		X	

([a]) Kinnita eelmist katset, kasutades sama eksperimendiplaani.
([b]) Korda katset poole logaritmilise ühiku suuruste kontsentratsioonivahemikega (mõlemale poole kontsentratsioonist, mis eelmises katses osutus oluliselt erinevaks).
([c]) Suuruse suhteline muutus (kordades) on lahusti kontrolliga võrreldes statistiliselt oluline ühel kontsentratsioonil.

Katseplaadi kvaliteedikontroll

48. Lisaks kvaliteedikontrolli plaadi kriteeriumide täitmisele tuleks täita ka muid kvaliteedikriteeriume, mis on seotud paralleelsüvendite tulemuste lubatavate erinevustega, korduskatsetega, hormooni määramise süsteemide lineaarsuse ja tundlikkusega, ühest ja samast proovist hormooni paralleelsete määramiste erinevustega ja tembitud hormoonipiikide taasleidmise protsendimääraga pärast keskkonna ekstraheerimist (kui seda tehakse; vt nõuded ekstraheerimisele, punkt 30); sellised kvaliteedikriteeriumid on esitatud tabelis 8. Andmed peaksid langema iga näitaja lubatavasse väärtuste vahemikku, ainult siis saab neid arvestada edasisel hindamisel. Kui need kriteeriumid ei ole täidetud, tuleks tabelis märkida, et kvaliteedikontrolli kriteeriumid ei olnud kõnealuses proovis täidetud; proov tuleks uuesti analüüsida või andmed välja visata.

Tabel 8

H295R-katse plaadi näitajate lubatavad väärtused ja varieerumisvahemik (%)

(LOQ — hormooni määramise süsteemi mõõtmispiir (*Limit of Quantification*); CV — variatsioonikordaja; SC — lahusti kontrollkatse; DPM — lagunemist minutis)

	Võrreldavad suurused	T	E2
Hormoonide baassüntees lahusti kontrolli katsetes	Suhteline suurenemine võrreldes LOQga	≥ 5 korda	≥ 2,5 korda
Kokkupuutekatsed — plaadisisene CV lahusti kontrolli katsetes (paralleelsüvendid)	Absoluutsed kontsentratsioonid	≤ 30 %	≤ 30 %
Kokkupuutekatsed — plaatidevaheline CV lahusti kontrolli katsetes (paralleelkatsed)	Muutus kordades	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormoonide mõõtmise süsteem — tundlikkus	Tuvastatav suhteline vähenemine, võrreldes lahusti kontrolliga	≥ 5 korda	≥ 2,5 korda
Hormoonide mõõtmise süsteem — kordusmõõtmised lahusti kontrollide CV ([a])	Absoluutsed kontsentratsioonid	≤ 25 %	≤ 25 %
Keskkonna ekstraheerimine — 3H-sisestandardi taasleidmine (vajaduse korral)	DPM	≥ 65 % nominaalsest	

([a]) Tähendab ühe ja sama proovi kordusmõõtmisi.

▼M5

KATSEANDMETE ANALÜÜS JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete analüüs

49. Selleks, et hinnata hormoonide sünteesi suhtelist suurenemist või vähenemist kemikaali juuresolekul, tuleb tulemused normeerida lahusti kontrolli tulemuste keskväärtusega igal plaadil, ja tulemused esitatakse suhteliste muutustena, võrreldes lahusti kontrolliga igal katseplaadil. Kõik andmed esitatakse kujul keskväärtus ±1 standardhälve (SD).

50. Andmete analüüsil arvestatakse ainult süvendeid, milles tsütotoksilisus oli alla 20 %. Suhtelised muutused tuleks arvutada järgmiselt:

suhteline muutus = (hormooni kontsentratsioon igas süvendis) ÷ (kõikide lahusti kontrollide hormooni kontsentratsiooni keskväärtus).

51. Kui süvendi visuaalse kontrollimise või punktis 42 kirjeldatud eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katsega näidati rakkude arvu suurenemist, tuleb seda näilist suurenemist kontrollida. Kui rakkude arvu suurenemist kontrollitakse, tuleks see märkida katseprotokolli.

52. Enne statistilise analüüsi tegemist tuleks hinnata normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse eelduste kehtivust. Normaaljaotust tuleks hinnata standardsete tõenäosusgraafikute või muu sobiva statistilise meetodiga (nt Shapiro-Wilki katse). Kui andmed (suhtelised muutused kordades) ei ole normaaljaotusega, tuleks püüda andmeid teisendada, et lähendada neid normaaljaotusele. Kui andmed on normaaljaotusega või ligikaudu normaaljaotusega, tuleks analüüsida erinevusi kemikaali kontsentratsioonirühmade ja lahusti kontrollide vahel, kasutades parameetrilist testi (nt Dunnetti test), milles *kontsentratsioon* on sõltumatu muutuja, ja *toime* (suhteline muutus kordades) on sõltuv muutuja. Kui andmed ei ole normaaljaotusega, tuleb kasutada sobivat mitteparameetrilist testi (nt Kruskal Wallis, Steeli mitmese võrdluse astaktest). Erinevused loetakse oluliseks $p \leq 0,05$ puhul. Statistiline hindamine tehakse iga süvendi keskväärtuste alusel, mis esindavad sõltumatuid paralleelidega andmepunkte. Eeldatakse, et kuna esimeses katses on dooside vahel suured vahed ($\log_{10}$ skaala), ei ole paljudel juhtudel võimalik täpselt kirjeldada kontsentratsiooni-toime sõltuvust, kui kaks kõrgeimat kontsentratsiooni on sigmoidse kõvera lineaarses osas. Seepärast kasutatakse esimese katse või muude andmete puhul, kus see olukord esineb (nt kui ei hinnata maksimaalset tõhusust), I tüüpi fikseeritud muutuja statistikat, nagu on kirjeldatud eespool.

53. Kui rohkem kui kaks andmepunkti asuvad kõvera lineaarsel osal ja on võimalik arvutada maksimaalseid tõhususi — nagu eeldatakse mõne teise katse juures, mille tegemisel kasutatakse poole logaritmilise ühiku suurusi kokkupuutekontsentratsioonide erinevusi — tuleks kasutada probit-, logit- või muud sobivat regressioonimudelit, et arvutada tõhususega seotud kontsentratsioone (nt EC50 ja EC20).

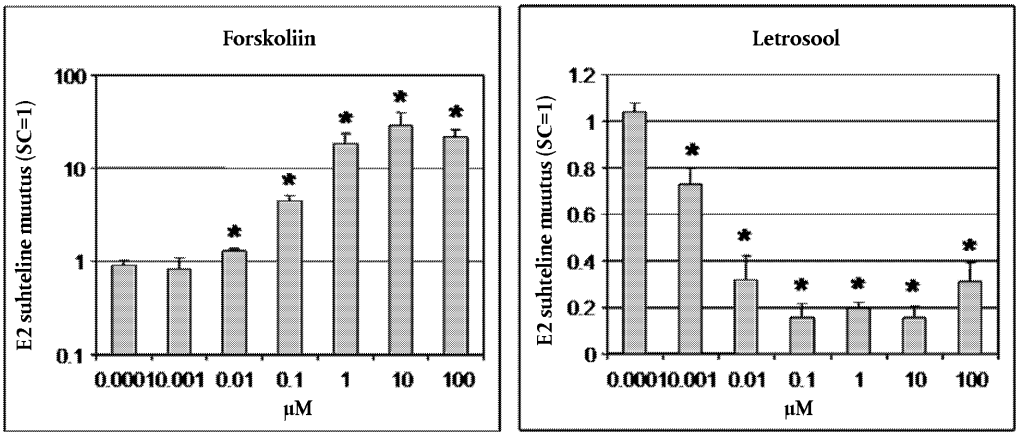
54. Tulemused tuleks esitada nii graafiliselt (tulpdiagrammid, mis näitavad keskväärtust ±1 SD) kui ka tabelina (LOEC/NOEC, mõju suund, ja maksimaalse toime tugevus, mis on osa andmete doosi-toime aspektist) (vt näide joonisel 3). Andmete hindamine on ainult siis kehtiv, kui see põhineb vähemalt kahel sõltumatul katsel. Katset loetakse sõltumatuks, kui see on läbi viidud muul kuupäeval, uute lahuste ja kontrollidega. Teises ja (vajaduse korral) kolmandas katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku võib valida esimese katse tulemuste põhjal, et paremini määratleda doosi-toime vahemik, milles asub LOEC (vt punkt 47).

▼M5

Joonis 3

H295R-katsega saadud andmete graafikuna ja tabelina esitamise ja hindamise näide

(tärn märgib statistiliselt olulisi erinevusi solvendi kontrollist ($p < 0,05$); LOEC — vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (*lowest observed effective concentration*); suurim muutus — toime maksimaalne tugevus igal kontsentratsioonil võrreldes lahusti kontrolli keskväärtusega (= 1))



Kemikaal	LOEC	Suurim muutus
forskoliin	0,01	0,15 korda
letrosool	0,001	29 korda

Andmete tõlgendamise kord

55. Uuritav kemikaal tunnistatakse positiivseks, kui suhteline aktivatsioon (kordades) on statistiliselt erinev ($p \leq 0,05$) lahusti kontrollist kahel kõrvuti oleval kontsentratsioonil vähemalt kahes sõltumatus katses (tabel 7). Uuritav kemikaal tunnistatakse negatiivseks pärast kahte sõltumatut negatiivset katset või pärast kolme katset, millest kaks olid negatiivsed ja üks ebaselge või positiivne. Kui andmed, mis on saadud kolme iseseisva katsega, ei vasta tabelis 7 loetletud otsustamise kriteeriumidele, ei ole uurimistulemused tõlgendatavad. Tulemusi, mis on saadud lahustuvuspiirist kõrgema või tsütotoksilise kontsentratsiooni juures, ei tohiks kasutada tulemuste tõlgendamiseks.

Katseprotokoll

56. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uurimislabor:

— nimi ja asukoht;

— uuringu juht, muud töötajad ja nende kohustused uuringu käigus;

— uuringu alguse ja lõpetamise kuupäevad.

▼**M5**

Uuritav kemikaal, reaktiivid ja kontrollid:

— identifitseerimisandmed (nimetus ja CASi number, kui on olemas), päritolu, partii number, puhtus, tarnija, ning uuritava kemikaali, reaktiivide ja kontrollide iseloomustus;

— uuritava kemikaali füüsiline olek ja asjaomased füüsikalis-keemilised omadused;

— uuritavate kemikaalide, reaktiivide ja kontrollide säilitustingimused ning katseks ettevalmistamise meetod ja sagedus;

— uuritava kemikaali stabiilsus.

Rakud:

— allikas ja rakutüüp;

— katses kasutatud rakkude passaažide arv (rakupassaaži tunnus);

— rakukultuuride säilitusmeetodite korra kirjeldus.

Enne katset täidetavad nõuded (vajaduse korral):

— uuritava kemikaali võimalik segav mõju hormoonide määramise süsteemile — kontrollkatse kirjeldus ja tulemused;

— hormoonide ekstraheerimise tõhususe mõõtmised — kirjeldus ja tulemused;

— kõigi tehtavate analüüside standard- ja kaliibrimiskõverad;

— valitud analüüsimeetodite avastamispiir.

Katsetingimused:

— keskkonna koostis;

— uuritava kemikaali kontsentratsioon;

— rakkude tihedus (hinnatud või mõõdetud rakkude kontsentratsioon 24 ja 48 tunni järel);

— uuritava kemikaali lahustuvus (lahustumispiir, kui see on määratud);

— inkubatsiooniaeg ja tingimused.

Katsetulemused:

— iga kontrollisüvendi ja kemikaaliga süvendi töötlemata andmed — iga üksiku mõõtmise tulemus otse sellisel kujul, mille annab hormoonide mõõtmiseks kasutatav vahend (nt optilise tiheduse ühikutes, fluorestsentsi ühikutes, lagunemiste arv minutis jne);

— normaaljaotuse eelduse kontrollimine või andmete teisendamise selgitus;

— keskmine toime ±1 standardhälve igas mõõdetud süvendis;

— tsütotoksilisuse andmed (uuritavad kontsentratsioonid, mis olid tsütotoksilised);

— kinnitus selle kohta, et kvaliteedikontrolli nõuded olid täidetud;

▼M5

— suhteline muutus võrreldes lahusti kontrolli proovidega, tsütotoksilisuse parandiga;

— tulpdiagramm, mis näitab suhtelist muutust (kordades) igal kontsentratsioonil, koos standardhälbe ja statistilise olulisusega, vt punktid 49–54.

Andmete tõlgendamine:

— andmete tõlgendamise korra kohaldamine tulemustele ja tähelepanekute arutelu.

Arutelu:

— kas tulemustest järeldub midagi võimaluse kohta, et T ja E2 andmeid võisid mõjutada kaudsed mõjud glüko- ja mineraalkortikoidide radadele?

Järeldused

KIRJANDUS

1) OECD (2002), Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik, käesoleva lisa peatüki B.54 2. liide.

2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114–124.

3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23 — 30.

4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/document/30/0,3746, en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html

5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html

6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Kättesaadav aadressil http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf

7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78–89.

8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44–54.

9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265–272.

▼**M5**

10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137–1148.

11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488–5496.

12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578–584.

13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777-2785.

14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137-1148.

15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731–737.

16) Käesoleva lisa peatükk B.55. Hershbergeri biokatse rottidel: kiire sõelkatse (anti)androgeensete omaduste väljaselgitamiseks

17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222–231.

18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55–63.

19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484–492.

▼M5

Liide

MÕISTED

CV (*Coefficient of Variation*) – variatsioonikordaja, määratletud kui jaotuse standardhälbe ja aritmeetilise keskmise suhtarv.

CYP – tsütokroom P450 monooksügenaasid, geenide ja nende järgi sünteesitud ensüümide perekond, mis osaleb väga paljude biokeemiliste reaktsioonide katalüüsimises, sealhulgas steroidhormoonide sünteesi ja metabolismi katalüüsimises.

DPM (*disintegrations per minute*) – lagunemiste arv minutis. See on teatava koguse radioaktiivse aine ühe minuti jooksul lagunenud aatomite arv.

E2 – 17β-östradiool, kõige tähtsam östrogeen imetajate hormoonisüsteemides.

H295R-rakud – inimese adrenokartsinoomi rakud, millel on tsonaalselt diferentseerumata inimloote neerupealise rakkude füsioloogilised omadused ning milles on ekspresseeritud kõik steroidogeneesi raja ensüümid. Selliseid rakke saab tellida ATCC-st.

Katse – sõltumatu eksperiment, mis tehakse uute lahuste ja uute kontrollidega.

Katseplaat – plaat, millel H295R-rakud viiakse kokkupuutesse uuritavate kemikaalidega. Katseplaadil on lahusti kontroll ja uuritav kemikaal seitsmes kontsentratsioonis, igaüks kolme paralleelina.

Kvaliteedikontroll (QC) – osutab meetmetele, mida on vaja võtta kasutamiskõlblike andmete saamiseks.

Kvaliteedikontrolli plaat – 24 süvendiga plaat, millel on positiivse ja negatiivse kontrolli kaks kontsentratsiooni, millega kontrollitakse uue rakkude partii toimimist või tehakse katse positiivsed kontrollid kemikaalide katsetamisel.

Kemikaal – aine või segu.

Külmutuskeskkond – keskkond, mida kasutatakse rakkude külmutamiseks ja milles hoitakse külmutatud rakke. Selle koostis on järgmine: varulahusekeskkond pluss BD NuSerum ja dimetüülsulfoksiid.

Laatumismäär – iseloomustab pinna katmise või paljunemise määra, mida rakkudele võimaldatakse kasvukeskkonna pinnal või sees.

Lineaarne osa – hormoonide määramise süsteemi standardkõvera osa, milles tulemus on võrdeline proovis oleva analüüdi kontsentratsiooniga.

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) – vähim avastatava mõjuga kontsentratsioon, mille juures katse tulemus on statistiliselt erinev lahusti kontrolli tulemusest.

LOQ (*Limit of Quantification*) – mõõtmispiir, väikseim kogus kemikaali, mida saab eristada kõnealuse kemikaali puudumisest (tühikatse) teatava usalduspiiri juures. Käesoleva meetodi puhul on LOQ tavaliselt katsesüsteemi valmistaja poolt ette antud, kui seda ei ole täpsustatud teisiti.

NOEC (*No Observed Effect Concentration*) – kõrgeim uuritud kontsentratsioon, mille juures analüüs ei näita positiivset tulemust.

Passaaž – kordade arv, millal rakud on pärast külmutatud tüvikultuurist kultuuri loomist aluselt eraldatud. Lähtepassaažile, mis tehakse külmutatud tüvikultuurist, omistatakse number üks (1). Rakud, mis on aluselt eraldatud üks kord, nimetatakse passaažiks 2 jne.

▼**M5**

PBS – Dulbecco fosfaatpuhvrilisandiga keedusoolalahus.

Steroidogenees – sünteesirada, mille kaudu kolesteroolist sünteesitakse mitmesugused steroidhormoonid. Steroidide sünteesi raja mitu vahesaadust nagu progesteroon ja testosteroon on ise olulised hormoonid; samas on nad sünteesiraja edasiste hormoonide eellased.

T – testosteroon, üks kahest kõige olulisemast androgeenist imetajate hormoonisüsteemides.

Trüpsiin 1X – lahjendatud trüpsiini (üks ensüüme, kõhunäärme seriinproteaas) lahus, mida kasutatakse rakkude eraldamiseks rakkude kasvatamise plaadilt, vt valideerimisaruande (4) III liide.

Täiendatud keskkond – varukeskkond pluss BD Nu-Serum ja ITS+ premium mix, vt valideerimisaruande (4) II liide.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Varukeskkond – lähtekeskkond, mis on alus muude reagendilahuste valmistamiseks. See koosneb Dulbecco modifitseeritud Eagle'i keskkonna ja Hami F-12 toitainesegust (DMEM/F12) vahekorras 1: 1 15 mM HEPES-puhvris, mis ei sisalda fenoolpunast ega Na-vesinikkarbonaati. Na-vesinikkarbonaat lisatakse puhverdamiseks, vt valideerimisaruande (4) II liide.

▼M5

B.58. TRANSGEENSE NÄRILISE SOMAATILISTE JA SUGURAKKUDE GEENIDE MUTATSIOONI KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 488 (2013). ELil on katsemeetodid paljude *in vitro* geenmutatsioonide uuringute tegemiseks, millega on võimalik avastada kromosoomide ja/või geenide mutatsioone. On olemas katsemeetodid *in vivo* näitajate (st kromosoomihälvete ja plaanivälise DNA sünteesi) määramiseks; kuid nendega ei saa mõõta geenimutatsioone. Transgeense närilise (*transgenic rodent*, TGR) mutatsiooni katse rahuldab vajaduse praktilise ja kergesti kättesaadava *in vivo* katse järele, millega saab määrata geenimutatsioone.

2. TGR-mutatsioonikatse kohta on avaldatud põhjalikke ülevaateid (24, 33). Nendes kasutatakse transgeenseid rotte ja hiiri, kelle kromosoomidesse on integreeritud rohkesti plasmiidi või faagi-ülekandevektorite koopiaid (transgeene). Transgeenid sisaldavad reportergeene mitmesugust tüüpi mutatsioonide avastamiseks, mida *in vivo* tekitavad uuritavad kemikaalid.

3. Närilises tekkivaid mutatsioone loendatakse transgeeni väljavõtmise ja reportergeeni fenotüübi analüüsimisega bakteriaalses peremees-organismis, kellel vastavat reportergeeni ei ole. TGR geenimutatsiooni katsetega mõõdetakse mutatsioone, mis on tekkinud geneetiliselt neutraalsetes geenides, mis eraldatakse praktiliselt kõikidest närilise kudedest. Nende katsetega võib seepärast üle saada paljudest olemasolevatest piirangutest, mis on seotud *in vivo* geenimutatsioonide uurimisega endogeensetes geenides (näiteks piiratud hulk analüüsikõlblikke kudesid, negatiivne või positiivne selektsioon mutatsioonide vastu).

4. Olemasolevad tõendid näitavad veenvalt, et transgeenid reageerivad mutageenidele samal viisil kui endogeensed geenid, eriti mis puutub alusepaari asendustesse, raaminihkemutatsioonidesse ning väikestesse deletsioonidesse ja insertsioonidesse (24).

5. Genotoksilisuse testimise rahvusvahelistel seminaridel (IWGT) on toetatud TGR-geenimutatsioonikatse kasutamist geenimutatsioonide avastamiseks *in vivo* ja on esitatud soovituslik katse-eeskiri selliste katsete tegemiseks (15, 29). Käesolev katsemeetod põhineb kõnealustel soovitustel. Käesoleva katse-eeskirja kasutamist toetav täiendav analüüs on esitatud viites (16).

6. Arvatavasti on tulevikus võimalik ühendada TGR-geenimutatsiooni katse korduvdoosi toksilisuse uuringuga (käesoleva lisa peatükk B.7). Siiski on vaja veel andmeid selle tõendamiseks, et korduvdoosi toksikoloogia uuringus kasutatav lühem ühepäevane vahe dooside manustamise lõpu ja proovide võtmise vahel ei mõjuta TGR-geenimutatsiooni katseid, mille puhul kasutatakse 3päevast ajavahemikku. On vaja ka andmeid, mis näitaksid, et transgeense näriliseliini kasutamine tavaliste näriliseliinide asemel ei kahjusta korduvdoosi katse tulemusi. Kui need andmed saadakse, tuleb käesolevat katsemeetodit ajakohastada.

7. Peamiste terminite tähendused on esitatud liites.

▼**M5**

LÄHTEKAALUTLUSED

8. TGR-geenimutatsiooni mudelsüsteemid, mille kohta on kogutud piisavalt andmeid, et toetada nende kasutamist käesolevas katsemeetodis, on järgmised: *lacZ*-bakteriofaag-hiir (Muta™Mouse); *lacZ*-plasmiid-hiir; *gpt*-delta- (*gpt*- ja Spi$^-$)-hiir ja -rott; *lacI*-hiir ja -rott (Big Blue®), kui katse tehakse standardtingimustes. Lisaks võib kasutada *cII*- positiivsevaliku katset, et hinnata mutatsioone Big Blue®- ja Muta™Mouse'i mudelites. Mutageneesi hinnatakse TGR-mudelite puhul tavaliselt mutantide sageduse järgi; vajaduse korral võib kasutada aga ka mutatsioonide molekulaaranalüüsi täiendava teabe saamiseks (vt punkt 24).

9. Need näriliste *in vivo* geenimutatsiooni katsed on eriti olulised mutageensuse ohu hindamisel, kuna katsete tulemused sõltuvad *in vivo* metabolismist, farmakokineetikast, DNA parandusprotsessidest ja DNA sünteesimehhanismi võimest kahjustusega toime tulla, kuigi need omadused võivad eri liikidel ja kudedel olla erinevad ja sõltuda ka DNA kahjustuse tüübist. *In vivo* meetod geenimutatsiooni täiendavaks uurimiseks on kasulik edasiseks uurimiseks, kui *in vitro* süsteemis on leitud mutageenne toime, samuti täiendavate *in vivo* näitajate väljaselgitamiseks (24). Lisaks sellele, et geenimutatsioonid on põhjuslikult seotud vähi tekkimisega, on need ka asjakohane näitaja muude mutatsioonipõhiste haiguste kui vähk (12, 13) ja pärilike haiguste tekkimise ennustamiseks.

10. Kui on tõendeid, et uuritav kemikaal või asjakohane metaboliit ei pääse mõne huvipakkuva koeni, siis ei ole transgeense närilise geenimutatsiooni katse asjakohane.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Punktis 8 kirjeldatud katsetes on sihtgeeniks bakteriaalse või bakteriofaagse päritoluga geen ning selle transgeeni närilise genoomsest DNAst väljaeraldamise vahendiks on transgeeni viimine λ-bakteriofaagisse või plasmiidsesse süstikvektorisse. Selleks ekstraheeritakse huvipakkuvast närilisekoest genoomne DNA, töödeldakse seda *in vitro* (süstikvektori taastamiseks pakendatakse λ-vektorid või ligeeritakse ja elektroporeeritakse plasmiidid) ja seejärel tehakse pärast peremeesorganismi (bakterisse) viimist sobivates tingimustes kindlaks mutatsioonid. Analüüsiks kasutatakse neutraalseid transgeene, mida saab enamikust kudedest hõlpsasti jälle välja võtta.

12. Tavaline TGR geenimutatsiooni katse hõlmab näriliste viimist teatavaks ajaks kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Kemikaale võib manustada mis tahes asjakohasel viisil, sealhulgas implantatsiooniga (nt meditsiiniseadme testimine). Kogu ajavahemikku, mille jooksul loomale manustatakse kemikaali, nimetatakse manustamisajaks. Manustamisele järgneb tavaliselt teatav aeg enne surmamist, mille jooksul kemikaali ei manustata ja mille jooksul parandamata DNA-kahjustused fikseeruvad püsivateks stabiilseteks mutatsioonideks. Kirjanduses on seda ajavahemikku nimetatud mitmel viisil: avaldumisaeg, kinnistumisaeg või väljendumisaeg (*manifestation, fixation, expression*); see ajavahemik lõpeb proovivõtuajaga(15, 29). Kui loom on surmatud, eraldatakse huvipakkuvatest kudedest DNA ja puhastatakse.

▼**M5**

13. Paljudest pakendamistest või ligeerimistest iga looma ühe koe kohta saadud andmed tavaliselt koondatakse ja muteerumise sagedus hinnatakse tavaliselt kokku 10^5–10^7 lüüsilaike või kolooniaid moodustava ühiku põhjal. Kui kasutatakse positiivseid selektsioonimeetodeid, määratakse lüüsilaike moodustavad ühikud eraldi mitteselektiivsete plaatidega.

14. Positiivsed selektsioonimeetodid on välja töötatud mutatsioonide avastamiseks nii *gpt*-geenis[*gpt*-delta-hiir ja -rott, *gpt*⁻-fenotüüp (20, 22, 28)] kui ka *lacZ*-geenis [Muta™Mouse või *lacZ*-plasmiid-hiir (3, 10, 11, 30)]; samas *lacI*-geeni mutatsioone Big Blue®-loomades tuvastatakse mitteselektiivse meetodiga, milles mutante avastatakse värvunud (siniste) lüüsilaikude tekkimise järgi. Positiivne selektsioonimeetod on loodud ka punktmutatsioonide avastamiseks λ-bakteriofaagsüstikvektori *cII*-geenis [Big Blue®-hiir või -rott ja Muta™Mouse (17)] ning deletsioonimutatsioonide leidmiseks λ *red* ja *gam* geenides [Spi⁻-selektsioon *gpt*-delta-hiire ja -roti puhul (21, 22, 28)]. Mutatsioonisagedusarvutatakse transgeenis lüüsilaike/plasmiide sisaldavate mutatsioonide arvu jagamisel lüüsilaikude/plasmiidide üldarvuga, mis on saadud samast DNA-proovist. Transgeense närilise geenimutatsiooni uuringute puhul esitatav näitaja on mutatsioonide sagedus. Lisaks sellele saab mutatsioonisageduse määrata sõltumatut mutatsiooni sisaldavate rakkude määrana; selle arvutuse jaoks on vaja eraldatud mutantide sekveneerimisega teha klooni kasvu arvestav parand(24).

15. Mutatsioonid, mis loendatakse *lacI, lacZ, cII* ja *gpt* punktmutatsioonide katsetes, kujutavad endast peamiselt alusepaari asenduse, raaminihke ning väikeste insertsioonide ja deletsioonidega seotud mutatsioone. Selliste mutatsioonitüüpide suhteline osa spontaansete mutatsioonide hulgas sarnaneb selle piirkonna endogeenses HPRT-geenis tekkivate mutatsioonide suhtelise osaga. Suuri deletsioone avastatakse ainult Spi⁻-selektsioonija *lacZ*-plasmiidi katsetega (24). Huvipakkuvad mutatsioonid on *in vivo* mutatsioonid, mis tekivad hiirtel või rottidel. *In vitro* ja *ex vivo* mutatsioonid, mis võivad tekkida faagi/plasmiidi tagasisaamisel, replikatsioonil või parandamisel, on võrdlemisi haruldased ja mõnes süsteemis on neid võimalik spetsiifiliselt tuvastada või välistada bakteriaalse peremeesorganismi/positiivse selektsiooni süsteemiga.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Loomaliigi valimine

16. Praegu on olemas mitmesuguseid transgeensete hiirte geenimutatsioonide tuvastamise mudeleid ja neid süsteeme kasutatakse laialdasemalt kui transgeense roti mudeleid. Kui rott on selgelt sobivam mudel kui hiir (nt kui uuritakse üksnes rottidel esineva kasvaja tekkimise mehhanismi, et korreleerida seda rottide puhul avalduva toksilisuse uuringuga, või kui metabolism rotis on teadaolevalt lähedasem metabolismile inimese organismis), siis tuleks kaaluda transgeense roti mudeli kasutamist.

Pidamis- ja söötmistingimused

17. Temperatuur katseloomade ruumis peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema hoida niiskust 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärast labori söödavalikut koos piiramatu

▼M5

hulga joogiveega. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali sobiv lisamine söödasse, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Loomi tuleb pidada väikestes rühmades, kuni viis samast soost looma, kui ei eeldata agressiivset käitumist. Loomi võib hoida eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud.

Loomade ettevalmistamine

18. Terved noored suguküpsuse saavutanud täiskasvanud loomad (vanus 8–12 nädalat katse alguses) määratakse juhuvaliku alusel kontrolli- ja doosirühmadesse. Loomad varustatakse individuaalse märgisega. Loomi harjutatakse laboritingimustega vähemalt viis päeva. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Uuringu alguses peaksid loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ja ei tohiks ületada ±20 % kummagi soo keskmisest massist.

Dooside ettevalmistamine

19. Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või kandeaines ja segada sööda või joogivee sisse enne loomadele andmist. Vedelat uuritavat ainet võib manustada vahetult või lahjendada enne manustamist. Sissehingamise kaudu toimuva kokkupuute korral manustatakse uuritavat kemikaali gaasi, auru või tahke/vedela aerosoolina, sõltuvalt kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Tuleks kasutada uuritava kemikaali värskeid valmistisi, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

Katsetingimused

Lahusti/kandeaine

20. Lahusti/kandeaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate dooside korral ega keemiliselt reageerida uuritava ainega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandeainest erinevat lahustit või ainet, peab olema võrdlusandmetega näidatud, et see on sobiv. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahuste/vee kui kandeaine kasutamist.

Positiivsed kontrollid

21. Tavaliselt tuleks kasutada paralleelselt positiivse kontrolli loomi. Labori puhul, kes on tõendanud oma pädevust (vt punkt 23) ja teeb selliseid katseid tavalises korras, võib meetodi edukuse tõenduseks lisada igasse katsesse DNA eelmisest positiivse kontrolli katsest. Selline varasema katse DNA peaks olema saadud sama loomaliigi samadest huvipakkuvatest kudedest ja see peaks olema nõuetekohaselt säilitatud (vt punkt 36). Kui kasutatakse samaaegset positiivset kontrolli, ei ole kontrollkemikaali vaja tingimata manustada samal viisil kui uuritavat kemikaali; siiski peaks positiivse kontrolli kemikaali kohta olema teada, et see põhjustab mutatsioone samas koes/samades kudedes, mis pakuvad huvi uuritava kemikaali puhul. Positiivse kontrolli kemikaali doosid tuleks valida nii, et mõju oleks nõrk või mõõdukas, et kriitiliselt hinnata katse tulemuslikkust ja tundlikkust. Positiivse kontrolli kemikaalide ja mõnede nende sihtkudede näited on esitatud tabelis 1.

▼M5

Tabel 1

Positiivse kontrolli kemikaalide ja mõnede nende sihtkudede näited

Positiivse kontrolli kemikaal ja selle CASi nr	EINECSi nimetus ja EINECSi nr	Kirjeldus	Mutatsiooni sihtkude	
			Rott	Hiired
N-etüül-*N*-nitrosokarbamiid [CASi nr 759-73-9]	*N*-etüül-*N*-nitrosokarbamiid [212-072-2]	Otse toimiv mutageen	Maks, kopsud	Luuüdi, käärsool, käärsoole epiteel, sool, maks, kopsud, põrn, neerud, munasarjade granuloosrakud, isaslooma sugurakud
Etüülkarbamaat (uretaan) [CASi nr 51-79-6]	Uretaan [200-123-1]	Mutageen, vajalik on metabolism, mõju on aga nõrk		Luuüdi, eelmagu, peensool, maks, kopsud, põrn
2,4-diaminotolueen [CASi nr 95-80-7]	4-metüül-*m*-fenüleendiamiin [202-453-1]	Mutageen, vajalik on metabolism, positiivne ka Spi⁻-katses	Maks	Maks
Benso[a]püreen [CASi nr 50-32-8]	Benso[def]krüseen [200-028-5]	Mutageen, vajalik on metabolism	Maks, rasvikud	Luuüdi, rinnanääre, käärsool, eelmagu, näärmemagu, süda, maks, kopsud, isaslooma sugurakud

Negatiivsed kontrollid

22. Igal proovide võtmisel peaksid olema negatiivsed kontrollid, loomad, kellele on manustatud ainult lahustit või kandeainet ja kes muidu on läbinud sama kohtlemise kui doosirühmad. Kui ei ole varasemaid või kirjanduses avaldatud kontrollandmeid, mis näitaksid, et valitud lahustil või kandeainel ei ole kahjulikku ega mutageenset toimet, tuleb igal proovide võtmisel kaasata ka loomad, kellele ei ole üldse midagi manustatud, et tõendada kandeaine kontrolli vastuvõetavust.

Labori pädevuse tõendamine

23. Pädevust nende katsete tegemises tuleks tõendada võimega korrata avaldatud andmetele (24) vastavaid järgmisi oodatavaid tulemusi: 1) mutatsioonide sagedus positiivse kontrolli kemikaalide puhul (kaasa arvatud nõrgatoimelised kemikaalid), nagu tabelis 1 esitatud kemikaalid, mittemutageenide puhul ja kandeaine kontrolli puhul ning 2) transgeeni tagasisaamine genoomsest DNA-st (nt pakendamise tõhusus).

Mutantide sekveneerimine

24. Regulatiivsete rakenduste puhul mutantide DNA sekveneerimist ei nõuta, eriti kui on saadud selge positiivne või negatiivne tulemus. Sekveneerimine võib siiski olla kasulik, kui individuaalsete loomade vahelised erinevused on suured. Sellistel juhtudel võib järjestuse määramist kasutada nn *jackpot*'i või kloonsete sündmuste võimaluse välistamiseks: sekveneerimisega määratakse ainulaadsete mutatsioonide osakaal konkreetses koes. Ühe looma ühe koe ligikaudu 10 mutandi sekveneerimine peaks olema piisav, et lihtsalt

▼M5

kindlaks teha, kas kloonmutandid võivad anda panuse mutatsioonide sagedusse; mutatsioonisageduse andmete matemaatiliseks parandamiseks klooniefektide suhtes tuleks sekveneerida kuni 25 mutanti. Mutantide sekveneerimist võib kaaluda ka siis, kui leitakse mutatsioonisageduse nõrk suurenemine (st vaid veidi rohkem mutatsioone kui kontrollkatses, kus kemikaali ei manustatud). Kui kemikaali saanud ja kontrollkatse mutandikolooniate spekter on erinev, võib see toetada mutageense toime oletust (29). Mutatsioonide spektrid võivad olla abiks ka toimemehhanismi käsitlevate hüpoteeside tegemisel. Kui uuringus nähakse ette sekveneerimine, tuleb uuringu kavandamisel olla eriti hoolikas, eriti ühe proovi kohta sekveneeritavate mutantide arvu määramisel, et tulemusel oleks vastavalt kasutatavale statistilisele mudelile piisav statistiline võimsus (vt punkt 43).

KATSE KORRALDUS

Loomade arv ja sugu

25. Loomade arv igas rühmas peaks olema eelnevalt kindlaks määratud nii, et see tagaks piisava statistilise võimsuse, mis võimaldaks tuvastada vähemalt mutantide arvu kahekordistumise. Rühmas on vähemalt viis looma; kui statistiline võimsus ei ole piisav, tuleks loomade arvu vastavalt vajadusele suurendada. Tavaliselt tuleks kasutada isasloomi. Võib esineda juhtusid, kus on õigustatud üksnes emasloomade kasutamine, näiteks kui uuritakse spetsiaalselt naiste jaoks ettenähtud ravimeid või uuritakse naissoole eripäraseid metabolismi aspekte. Kui kemikaali toksilisuses või metabolismis esineb märkimisväärseid soospetsiifilisi erinevusi, on vaja uurida nii isas- kui ka emasloomi.

Manustamisperiood

26. Kuna on kindlaks tehtud, et mutatsioonid akumuleeruvad iga manustamiskorraga, on vaja kasutada korduvdoosi manustamise režiimi — manustamist iga päev 28 päeva jooksul. Seda peetakse üldiselt rahuldavaks, kuna niimoodi tekib ka nõrga mutageeniga piisavalt palju mutatsioone ja see on piisav kokkupuuteaeg mutatsioonide avastamiseks aeglaselt kasvavates organismides. Mõne hindamise puhul võib olla sobiv muu manustamisrežiim, mille kasutamist tuleks uuringu protokollis teaduslikult põhjendada. Kemikaali manustamise aeg ei tohiks olla lühem kui aeg, mis on vajalik kõikide asjakohaste metabolismiensüümide täielikuks induktsiooniks; lühema manustamisperioodi puhul võib olla vaja kasutada mitut proovide võtmise aega, mis sobivad eri kasvukiirusega organite jaoks. Igal juhul tuleks katse-eeskirja põhjendamiseks kasutada kogu kättesaadavat teavet (nt üldise toksilisuse, metabolismi ja farmakokineetika kohta), eriti kui kaldutakse kõrvale eespool esitatud standardsoovitustest. Pikemat manustamisperioodi kui 8 nädalat tuleks selgelt põhjendada ja õigustada, sest kuigi see võib suurendada katse tundlikkust, võib see põhjustada mutantide sageduse näilist suurenemist klooni kasvu tagajärjel (29).

Doositasemed

27. Doositasemed peaksid põhinema tulemustel, mis on saadud doosivahemiku leidmise katsega, milles mõõdetakse üldist mürgisust samasuguse manustamis- või kokkupuuteviisi puhul, või varasemate alaägeda mürgistuse uuringute tulemustel. Doosivahemiku leidmiseks võib kasutada sama näriliseliini mitte-transgeenseid loomi. Doosi ja toime vahelist seost käsitleva teabe saamiseks peaks täielikus põhikatses olema negatiivne kontrollrühm (vt punkt 22) ja vähemalt kolm sobiva vahemikuga doositaset, välja arvatud juhul, kui kasutatakse piirdoosi (vt punkt 28). Suurim doos peaks vastama

▼M5

suurimale talutavale doosile. Suurim talutav doos on doos, mis põhjustab selliseid mürgistusenähte, et sama manustamiskava puhul põhjustaks veel suurem doos juba surma. Kemikaalid (näiteks hormoonid ja mitogeenid), millel juba madala mittetoksilise doosi juures on teatav bioloogiline aktiivsus, ja sellised kemikaalid, mille toksiko-kineetilistes omadustes esineb küllastumine, moodustavad erandi üldistest doosivaliku kriteeriumidest ja neid tuleks igal juhul hinnata konkreetselt. Doositasemetega tuleks katta kogu vahemik suurimast talutavast doosist kuni vähese mürgisuseni või mürgisuse puudumiseni.

Piirdoosikatse

28. Kui doosivahemiku leidmise katsed või lähedaste näriliseliinide andmed osutavad, et vähemalt piirdoosi manustamine ei põhjusta närilisele täheldatavaid toksilisi mõjusidja kui struktuurilt lähedaste kemikaalide andmete põhjal ei ole karta genotoksilisust, ei tarvitse täielik uuring kolme doositasemega olla vajalik. 28-päevase manustamisperioodi (28 manustamist üks kord päevas) puhul on piirdoos 1 000 mg kehakaalu kg kohta päevas. Kui manustamisperiood on 14 päeva või lühem, on piirdoos 2 000 mg kehakaalu kg kohta päevas (dooside manustamise kavad, mis erinevad 28-päevasest manustamisest, peaksid olema katseprotokollis teaduslikult põhjendatud; vt punkt 26).

Dooside manustamine

29. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt sundsöötmisega maosondi kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Üldiselt tuleks katse kavandamisel silmas pidada inimese võimalikku kokkupuuteviisi. Seepärast võib kasutada muid kokkupuuteviise (näiteks joogiveega, nahaaluse süstiga, intravenoosselt, nahale määrimisega, sissehingamisega, trahheasse juhtimisega, söödaga või implantaadiga), kui neid saab põhjendada. Süstimist kõhukelmesse ei soovitata, kuna see ei ole inimese kokkupuute seisukohast asjakohane. Vedeliku suurim kogus, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus ei tohiks ületada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema mahu kasutamise korral tuleb seda põhjendada. Välja arvatud ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide dooside korral jääks samaks.

Proovivõtuaeg

Somaatilised rakud

30. Proovide võtmise aeg on väga oluline muutuja, sest see on määratud ajavahemikuga, mis kulub mutatsioonide fikseerumiseks. See ajavahemik on koespetsiifiline ja näib olevat seotud rakupopulatsiooni uuenemisajaga; luuüdi ja soolestiku puhul on toime kiire, maksa puhul on see palju aeglasem. Sobiv kompromiss mutatsioonisageduse mõõtmiseks nii kiiresti kui ka aeglaselt kasvavate kudede korral on manustamine 28 järjestikusel päeval (vt punkt 26) ja proovide võtmine kolm päeva pärast viimast manustamist, kuigi maksimaalne mutantide sagedus ei tarvitse nendes tingimustes aeglaselt kasvavate kudede puhul veel avalduda. Kui aeglaselt kasvavad koed on eriti olulised, võib hilisem proovide võtmise aeg 28 päeva pärast 28-päevase manustamisperioodi lõppu olla kohasem (16, 29). Sellisel juhul asendaks hilisem proovivõtuaeg proovide võtmise pärast kolme päeva, ning see nõuaks teaduslikku põhjendust.

▼**M5**

Sugurakud

31. Transgeense närilise katse sobib hästi isaslooma sugurakkudes põhjustatud mutatsioonide uurimiseks (7, 8, 27), kuna spermatogeneesi ajastust ja kineetikat on palju uuritud (27). Analüüsiks kättesaadavate munarakkude väike arv, isegi pärast superovulatsiooni, ning asjaolu, et munarakus ei toimu DNA sünteesi, välistavad transgeense närilise katse kasutamise mutatsioonide tekkimise uurimiseks emaslooma sugurakkudes (31).

32. Proovide võtmise aeg isaslooma sugurakkude puhul valitakse nii, et proovid kogutakse kõikidest kogu suguraku arengutsükli jooksul kemikaaliga kokkupuutunud rakutüüpidest; jälgitakse, et see staadium, mille proove eriti tahetakse saada, oleks piisavalt kaua kemikaaliga kokku puutunud. Aeg, mis kulub arenevatel sugurakkudel jõudmiseks spermatogooniumi tüvirakkudest küpse spermatosoidi staadiumini seemnejuhas või munandimanuse sabas,on ~49 päeva hiire (36) ja ~70 päeva roti (34, 35) puhul. Sperma, mis kogutakse pärast 28-päevast kokkupuuteperioodi ja sellele järgnevat kolmepäevast ajavahemikku proovide võtmiseni seemnejuhast ja munandimanuse sabast (7, 8), kujutab endast rakkude populatsiooni, mis on olnud kemikaaliga kokkupuutes umbes poole spermatogeneesi ajast; see spermatogeneesi lõpp-periood hõlmab meioosi ja sellele järgnevaid etappe, kuid ei hõlma spermatogooniumi- ega tüvirakuetappi. Selleks, et saada seemnejuhast ja munandimanuse sabast õigeid proove rakkudest, mis olid spermatogooniumi tüvirakud kokkupuuteperioodi ajal, tuleb pärast kemikaali manustamise lõppu proovide võtmisele eelnevale ajale lisada hiire puhul vähemalt 7 nädalat ja roti puhul 10 nädalat.

33. Pärast 28 + 3 päeva pikkust katseperioodi seemnekanalikestest väljasurutud rakud kujutavad endast segapopulatsiooni, milles on kõiki sugurakkude arengu staadiume (7, 8). Nendest rakkudest proovide võtmine geenimutatsioonide avastamiseks ei võimalda nii täpselt hinnata, millistes suguraku arengu etappides tekivad mutatsioonid, kui seemnejuhast või munandimanuse sabast kogutud spermatosoidiproovid (kuna seemnekanalikestest saadud proovis on palju sugurakutüüpe ja ka somaatilisi rakke, mis saastavad seda rakupopulatsiooni). Kuid rakuproovi võtmine seemnekanalikestest lisaks spermatosoidiproovile seemnejuhast või munandimanuse sabast pärast üksnes 28 + 3 päeva pikkust katseperioodi võimaldab saada mingid proovid kõikidest rakkudest, mis on olnud kemikaaliga kokkupuutes enamiku suguraku küpsemise faaside ajal, ja see võib olla kasulik mõnede suguraku mutageenide tuvastamiseks.

Vaatlused

34. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas, soovitavalt iga kord samal ajal ning võttes arvesse, et oodatud tulemusi esineb kõige rohkem pärast doseerimist. Üles tuleks märkida loomade tervislik seisund. Vähemalt kaks korda päevas tuleks kontrollida, ega loomad ei ole haigestunud või surnud. Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas ja surmamisel. Sööda tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist mõõta pärast iga veevahetust ja vähemalt üks kord nädalas. Loomad, kellel leitakse raske mürgistuse tunnuseid, mis ei ole küll surmavad, tuleks humaanselt surmata enne katse lõppu (23).

▼M5

Kudede kogumine

35. Kudede kogumise põhjendus peaks olema selgelt määratletud. Kuna mutatsioonide tekkimist on võimalik uurida peaaegu igas koes, peaks kogutavate kudede valimine põhinema uuringu tegemise eesmärgil ja kõikidel uuritava kemikaali kohta saadud mutageensuse, kantserogeensuse ja mürgisuse andmetel. Olulised tegurid, mida tuleks kaaluda, peaksid hõlmama vähemalt järgmist: manustamisviis (põhineb inimeste tõenäolisel kokkupuuteviisil), jaotumine kudedes ja võimalik toimemehhanism. Taustteabe puudumise korral tuleks koguda paljusid somaatilisi kudesid, kuna need võivad pakkuda huvi. Nende hulgas peaks olema kiiresti kasvavaid, aeglaselt kasvavaid ja kokkupuutekoha kudesid. Lisaks tuleks koguda spermatosoide seemnejuhast ja munandimanuse sabast ning arenevaid sugurakke seemnekanalikestest (nagu on kirjeldatud punktides 32 ja 33) ja säilitada hilisema analüüsi jaoks, kui on vaja määrata mutageensust sugurakkude suhtes. Tuleks määrata elundite massid ja suuremate elundite puhul tuleks kõikidelt loomadelt koguda üks ja sama piirkond.

Kudede ja DNA säilitamine

36. Kudesid või nende homogenaate tuleb säilitada temperatuuril alla —70 °C ja kasutada DNA eraldamiseks viie aasta jooksul. Eraldatud DNA, mida säilitatakse temperatuuril 4 °C sobivas puhverlahuses, tuleks kasutada mutatsioonide analüüsiks 1 aasta jooksul.

Kudede valimine mutantide analüüsiks

37. Kudede valimisel tuleks arvestada järgmist: 1) manustamistee või esimese kokkupuute koht (nt näärmemagu suukaudsel manustamisel, kopsud sissehingamisega manustamisel, nahk, kui määritakse nahale) ja 2) farmakokineetilised näitajad, mida vaadeldakse üldistes mürgisuse uuringutes, mis näitavad levikut kudedesse, püsimist kudedes või kogunemist kudedesse, samuti mürgisuse sihtorganid. Kui uuring tehakse kantserogeensusuuringu jätkuna, tuleks arvestada kantserogeensuse sihtkudesid. Analüüsi jaoks kudede valimisel tuleks seada eesmärgiks selliste kemikaalide tuvastamine, mis on otse toimivad *in vitro* mutageenid, mis kiiresti metaboliseeritakse, on väga reaktsioonivõimelised või neelduvad halvasti või mille sihtkude on määratud manustamisteega (6).

38. Kui taustteavet ei ole ning võttes arvesse kokkupuute kohta, mis on määratud manustamisviisiga, tuleks mutageensust hinnata maksa ja vähemalt ühe kiiresti jaguneva koe (nt näärmemagu, luuüdi) järgi. Enamikul juhtudel võib eespool nimetatud nõuded täita kahe hoolikalt valitud koe analüüsiga, kuid mõnel juhul oleks vaja analüüsida kolme või enamat kude. Kui on põhjust eriti muretseda mõju pärast sugurakkudele, sealhulgas positiivse tulemuse pärast somaatilistes rakkudes, tuleks mutatsioonide suhtes uurida sugurakkude kudesid.

Mõõtmismeetodid

39. Standardsed avaldatud laborimeetodid mutantide avastamiseks on kättesaadavad järgmiste soovitatavate transgeenimudelite jaoks: *lacZ* λ-bakteriofaag ja -plasmiid (30); *lacI* hiir (2, 18); *gpt* delta hiir (22); *gpt* delta rott (28); *cII* (17). Muudatused peavad olema nõuetekohaselt põhjendatud ja dokumenteeritud. Mitme pakendi andmed saab koondada ja kasutada selleks, et saavutada piisav arv lüüsilaike või kolooniaid. Kui vajaliku arvu lüüsilaikude saamiseks on vaja suurt arvu pakendamisreaktsioone, võib see näidata DNA halba kvaliteeti. Sellisel juhul tuleks andmeid hoolikalt kaaluda, kuna need ei tarvitse olla usaldusväärsed. Lüüsilaikude või kolooniate optimaalne

▼M5

koguarv DNA- proovi kohta on määratud statistilise tõenäosusega, et õnnestub kindlaks teha piisav arv mutante teatava spontaanse mutatsioonisageduse juures. Üldiselt on vaja vähemalt 125 000 — 300 000 lüüsilaiku, kui spontaanne mutatsioonisagedus on suurusjärgus 3×10^{-5} (15). Big Blue® *lacI* katse puhul on oluline näidata, et kogu mutantide värvusfenotüüpide vahemikku saab avastada; selleks lisatakse sobivad värvuse kontrollid paralleelselt igale plaadile. Koed ja saadavad proovid (näidised) tuleks töödelda ja analüüsida plokkskeemi alusel, milles lahusti/kandeaine kontrollrühma, positiivse kontrolli rühma (kui seda kasutatakse) või positiivse kontrolli DNA (kui see on asjakohane) ja iga doosirühma näidised töödeldakse koos.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

40. Andmed üksikute loomade kohta esitatakse tabeli kujul. Katseühikuks on loom. Protokollis tuleks esitada lüüsilaike moodustavate ühikute (*plaque-forming units*, PFU) või kolooniaid moodustavate ühikute (*colony-forming units*, CFU) koguarv, mutantide arv ja mutatsioonide sagedus iga looma iga koe puhul. Kui tegemist on paljude pakendamis- või vabastamisreaktsioonidega, tuleks esitada reaktsioonide arv iga DNA-näidise kohta. Andmed iga üksiku reaktsiooni kohta tuleks säilitada, kuid protokollis on vaja esitada ainult vaid PFU-de või CFU-de üldarv. Tuleks esitada andmed mürgisuse kohta ja kliinilised tunnused, vt punkt 34. Iga analüüsitud mutandi puhul tuleb esitada kõik sekveneerimisandmed, samuti nendest tulenevad mutatsioonisageduse andmed iga looma ja iga koe kohta.

Tulemuste statistiline hindamine ja tõlgendamine

41. On mitmeid kriteeriume positiivse tulemuse määramiseks, nagu muteerumissageduse suurenemine sõltuvalt kemikaali doosist või mutatsioonide sageduse selge suurenemine ühes doosirühmas, võrreldes lahusti/kandeaine kontrollrühmaga. Doosi-toime sõltuvuse jaoks piisavate andmete saamiseks on vaja uurida vähemalt kolme doosirühma. Peamine arvesse võetav tegur on tulemuste bioloogiline asjakohasus, kuid katsetulemuste hindamiseks võib kasutada sobivaid statistilisi meetodeid (4, 14, 15, 25, 26). Kasutatavate statistiliste testide korral tuleks eksperimendiühikuks pidada üksiklooma.

42. Uuritavat kemikaali, millega saadavad tulemused ühegi koe puhul ei vasta eespool esitatud kriteeriumidele, peetakse käesoleva katsemeetodi kohaselt negatiivseks. Et negatiivset tulemust saaks pidada bioloogiliselt asjakohaseks, tuleks koe kokkupuudet kemikaaliga tõendada.

43. DNA sekveneerimisanalüüside puhul võib tulemuste tõlgendamisel kasutada mitmeid statistilisi lähenemisviise (1, 5, 9, 19).

44. Toime bioloogilise olulisuse hindamisel võib juhinduda sellest, kas leitud väärtused on varasemate kontrollkatsete vahemikus või väljaspool seda vahemikku (32).

▼M5

Katseprotokoll

45. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— identifitseerimisandmed ja CASi nr, kui see on teada;

— allikas, partii number, kui on olemas;

— füüsikaline olek ja puhtus;

— uuringu tegemisel olulised füüsikalis-keemilised omadused;

— uuritava kemikaali stabiilsus, kui see on teada.

Lahusti/kandeaine:

— kandeaine valiku põhjendus;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines, kui on teada;

— sööda, joogivee või sissehingamise kaudu manustamiseks sobiva vormi valmistamine;

— osutatud vormi analüüsid (nt, stabiilsus, ühtlus, nominaalsed kontsentratsioonid).

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, sööt jne;

— iga looma mass katse alustamisel, sh kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

— positiivseid ja negatiivseid (lahus/kandeaine) kontrollkatseid käsitlevad andmed;

— vahemiku leidmise uuringu andmed;

— doositaseme valimise põhjendus;

— uuritud kemikaali preparaadi üksikasjad;

— uuritud kemikaali manustamise üksikasjad;

— manustamistee põhjendus;

— looma suhtes avalduva mürgisuse mõõtmise meetodid, sealhulgas histopatoloogilised või hematoloogilised analüüsid, kui need on tehtud, ja loomade vaatluste ja kehamassi määramise sagedus;

— meetodid, millega kontrolliti, et uuritav kemikaal jõudis sihtkoesse või üldvereringesse, kui tulemused olid negatiivsed;

▼**M5**

— tegelik doos (mg kehakaalu kg kohta päevas), mis arvutatakse sööda/-joogivee tarbimise ja selles uuritava kemikaali sisalduse (ppm) järgi, kui see on kohaldatav;

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus ja nende valiku põhjendused;

— humaanse surmamise meetod;

— kudede eraldamise ja säilitamise kord;

— näriliste genoomse DNA eraldamise, transgeeni genoomsest DNA-st vabastamise ja transgeense DNA bakteriaalsesse peremeesorganismi ülekandmise meetodid;

— kõikide rakkude, katsekomplektide ja reaktiivide allikad ja partiide numbrid (vajaduse korral);

— mutantide loendamine meetodid;

— mutantide molekulaarse analüüsi, kloonsuse paranduse kasutamise ja mutatsioonide sageduse arvutamise meetodid, kui see on kohaldatav.

Tulemused:

— loomade seisund enne katset ja kogu katse ajal, sealhulgas mürgistuse tunnused;

— keha ja elundite massid surmamisel;

— iga koe ja looma kohta mutantide arv, hinnatud lüüsilaikude või kolooniate arv, mutatsioonide sagedus;

— iga koe ja loomade rühma kohta pakendamisreaktsioonide arv DNA proovi kohta, mutantide üldarv, keskmine muteerumissagedus, standardhälve;

— doosi ja toime suhe, võimaluse korral;

— iga koe ja looma kohta sõltumatute mutantide arv ja keskmine mutatsioonisagedus, kui tehti mutatsioonide molekulaarne analüüs;

— paralleelsed ja varasemad negatiivse kontrolli andmed, nende vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;

— paralleelse positiivse kontrolli (või mitteparalleelse positiivse kontrolli DNA) andmed;

— analüütilised määramised, kui need on kättesaadavad (nt DNA kontsentratsioon, mida kasutati pakendamisel, DNA sekveneerimise andmed);

— kasutatud statistilised analüüsid ja meetodid.

Tulemuste arutelu

Kokkuvõte

▼**M5**

KIRJANDUS

1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391–396.

2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res*., 518: 107–112.

3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659

4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice' *, Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res*., 388(2–3): 197–212.

9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo', Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 86(20): 7971–7975.

11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125–136.

13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, **705: 96–106**.

14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

15) Heddle, J.A*.,* S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253–259.

16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.

▼**M5**

17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073-9078.

18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772–778.

20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi$^-$ and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi $^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

23) 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, N^{o}19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Paris.

24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^o 103, ENV/JM/-MONO(2009)7, OECD, Paris.

25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164–193.

28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71–78.

29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141–151.

30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo'* in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391–410.

▼**M5**

31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1–2): 117–123.

32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/-MONO(2011)20, OECD, Paris.

34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198–236.

35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.

36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

▼M5

Liide

MÕISTED

Alusepaari asendumine – mutatsioonitüüp, mille tulemusel üksainus DNA nukleotiidipaar asendub muu nukleotiidipaariga.

Cos-sait – 12 nukleotiidi pikkune üheahelaline DNA-lõik, mis asub λ-bakteriofaagi kaheahelalise genoomi mõlemas otsas.

Deletsioon – mutatsioon, millega genoomist läheb kaduma üks nukleotiid või (järjestikuste) nukleotiidide lõik.

Ekstrabinomiaalne variatsioon – populatsiooni osatähtsuse korduvate hindamiste suurem varieeruvus, kui võiks oodata juhul, kui populatsioonil on binomiaaljaotus.

Elektroporeerimine – elektriimpulsside kasutamine rakumembraanide läbilaskvuse suurendamiseks.

Endogeenne geen – genoomile algselt omane geen.

Insertsioon – genoomile ühe nukleotiidse alusepaari või (järjestikuste) nukleotiidsete alusepaaride lõigu lisamine.

Jackpot – suur arv mutante, mis on tekkinud ühestainsast mutatsioonist klooni kasvu tulemusel.

Kapsiid – valgukest, mis ümbritseb viiruseosakest.

Kemikaal – aine või segu.

Klooni kasv – paljude rakkude tekkimine ühestainsast (muteerunud) rakust.

Kolooniaid moodustav ühik (*colony-forming unit*, CFU) – eluvõimeliste bakterite arvu näitav suurus.

Konkatameer – pikk pidev biomolekul, mis koosneb paljudest ahelaks ühendatud ühesugustest koopiatest.

Ligeerimine – DNA-molekulide kahe otsa kovalentne linkimine DNA-ligaasi toimel.

Lüüsilaikusid moodustav ühik (*plaque forming unit*, PFU) – eluvõimeliste bakteriofaagide arvu näitav suurus.

Manustamisperiood – kogu ajavahemik, mille jooksul loomale manustatakse kemikaalidoose.

Mitogeen – kemikaal, mis stimuleerib rakku alustama jagunemist ja käivitab sellega mitoosi (raku jagunemise).

Neutraalne geen – geen, mida ei mõjuta ei positiivne ega negatiivne selektsiooniline surve.

Pakendamine – nakatamisvõimeliste faagiosakeste sünteesimine faagi kapsiidi ja faagi saba valkude valmistisest ning faagi DNA-molekulide konkatameerist. Kasutatakse tavaliselt kloonitud DNA pakendamiseks λ-vektorisse (mis on eraldatud cos-saitidega), et saada nakatamisvõimelised λ-osakesed.

Pakendamise tõhusus – tõhusus, millega pakendatud bakteriofaagid leitakse peremeesbakterites.

Positiivne selektsioon – meetod, mille puhul jäetakse ellu üksnes mutandid.

▼M5

Proovivõtuaeg – surmamisele eelneva ajavahemiku lõpp, mille kestel kemikaali ei manustata ja parandamata DNA-kahjustused fikseeruvad püsivateks stabiilseteks mutatsioonideks.

Punktmutatsioon – üldine termin, millega tähistatakse üksnes väikses DNA-lõigus toimunud mutatsiooni, hõlmab insertsioone, deletsioone ja alusepaari asendumisi.

Raaminihke mutatsioon – geneetiline mutatsioon, mis tekib valku või peptiidi kodeerivas DNA-järjestuses, kui insertsiooniga on lisatud või deletsiooniga eemaldatud selline arv nukleotiide, mida ei saa jäägita jagada kolmega.

Reportergeen – geen, mille mutantne geenisaadus on kergesti avastatav.

Suur deletsioon – DNA-st mitme tuhande alusepaari väljalangemine (mida saab tõhusalt kindlaks teha Spi^--selektsiooni ja lacZ-plasmiidi katsega).

Süstikvektor – selliselt konstrueeritud vektor, mis saab paljuneda kahes erinevas peremeesliigis; tänu sellele saab süstikvektorisse sisestatud DNA-d tuvastada või muuta kahes erinevat tüüpi rakus või kahes erinevas organismis.

Transgeenne – iseloomustab organismi, mille genoomi on muudetud sellesse muu liigi geeni või geenide sisseviimisega, või on sellega seotud.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M7

B.59. NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN CHEMICO*: OTSENE REAKTSIOONIVÕIME KATSE PEPTIIDIDEGA (*DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY*, DPRA)

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 442C (2015). Naha sensibilisaator on aine, mis põhjustab nahaga kokkupuutel allergilise reaktsiooni, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (ÜRO GHS) (1) ja Euroopa Liidu määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus) ([1]). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse *in chemico* meetodit (otsene reaktsioonivõime katse peptiididega, *Direct Peptide Reactivity Assay*, DPRA), mida tuleb kasutada, et eristada naha sensibilisaatoreid nahka mitte sensibiliseerivatest ainetest kooskõlas ÜRO GHSi ja CLP-määrusega.

Naha sensibiliseerumise oluliste bioloogiliste etappide suhtes on olemas ühisarusaam. Olemasolev teave naha sensibiliseerimisega seotud keemiliste ja bioloogiliste mehhanismide kohta on kokku võetud kahjuliku toime raja (*Adverse Outcome Pathway*, AOP) käsitluses (2), milles kirjeldatakse kõiki etappe alates protsessi käivitavast molekulaarsest etapist vahestaadiumide kaudu kuni kahjuliku toimeni, nimelt allergilise kontaktdermatiidini inimeste puhul või kontakthüpersensitiivsuseni närilistel. Naha sensibiliseerimise kahjuliku toime rajas on käivitavaks molekulaarse tasandi etapiks elektrofiilsete ainete kovalentne sidumine naha valkude nukleofiilsete tsentritega.

Nahka sensibiliseeriva toime hindamiseks on tavaliselt kasutatud katseloomi. Merisigu kasutatakse klassikalistes meetodites, nagu Magnussoni ja Kligmani meetodil merisea maksimeeritud nahaärritustest (*Guinea Pig Maximisation Test*, GMPT) ja Buehleri katse (katsemeetod B.6 (3)), millega uuritakse nii naha sensibiliseerimise induktsiooni- kui ka avaldumisfaasi. Kõigi hiirtega läbiviidavate katsetega, s.o lokaalsete lümfisõlmede katse (*Local Lymph Node Assay*, LLNA, katsemeetod B.42 (4)) ja selle kahe radioaktiivse märgistuseta modifikatsiooni puhul (LLNA: DA (katsemeetod B.50 (5)) ja LLNA: BrdU-ELISA (katsemeetod B.51 (6)), hinnatakse ainult induktsioonina avalduvat toimet, kuid need on samuti heaks kiidetud, sest loomade heaolu seisukohast on neil eeliseid, võrreldes merisigade kasutamisega katsetes, ja nendega saab naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi objektiivselt mõõta.

Hiljuti on mehhanistlikul käsitlusel põhinevad *in chemico* ja *in vitro* katsemeetodid arvatud teaduslikult põhjendatuks kemikaalidest tuleneva naha sensibiliseerimise ohu hindamiseks. Kuna igas loomadeta tehtavas katses (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) on kahjuliku toime raja käsitlus piiratud ja mehhanistlik (2, 7), on vaja katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, IATA, edaspidi „ühtne lähenemisviis“) raames katseid kombineerida, et saaks täielikult loobuda praegu kasutatavatest loomkatsetest.

DPRA on ette nähtud naha sensibiliseerimise kahjuliku raja käivitamise molekulaarse etapi, nimelt valkudega reageerimise hindamiseks, ning sellega mõõdetakse kvantitatiivselt uuritavate kemikaalide võimet reageerida lüsiini või tsüsteiini sisaldavate sünteetiliste tehispeptiididega (8). Seejärel kasutatakse tsüsteiini ja lüsiini sisaldavate peptiidide sisalduse vähenemise protsendilisi väärtusi, et klassifitseerida aine ühte neljast reaktsioonivõime klassist, mis aitab eristada naha sensibilisaatoreid nahka mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest (9).

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼M7

DPRA meetodit on hinnatud Euroopa Liidu Alternatiivsete Meetodite Tõestamise Keskuse referentlabori (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*, EURL ECVAM) juhitud valideerimisuuringus, misjärel on selle sõltumatult läbi vaadanud EURL ECVAM-i teaduslik nõuandekomitee (*EURL ECVAM Scientific Advisory Committee*, ESAC) ning selle kasutamist peeti teaduslikult põhjendatuks ühtse lähenemisviisi osana, et aidata eristada naha sensibilisaatoreid nahka mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest nende ohukategooriatesse klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil. Näited DPRA andmete kasutamisest kombinatsioonis muu teabega on avaldatud teaduskirjanduses (11–14).

Mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED, KASUTATAVUS JA PIIRANGUD

Valkudega reageerimise võime ja nahka sensibiliseeriva toime vaheline korrelatsioon on kindlalt tõendatud (15–17). Kuigi valguga seondumine on etapp, mis molekulaarsel tasandil käivitab naha sensibiliseerimise kahjuliku toime raja, on see siiski vaid üks olulistest etappidest, ning valkudega reageerimise võime kohta nii katsetega kui ka muude kui katsemeetoditega saadav teave ei pruugi iseendast olla piisav järelduse tegemiseks, et kemikaal ei sensibiliseeri nahka. Seepärast tuleks käesoleva meetodiga saadud andmeid käsitada ainult seoses selliste ühtsete lähenemisviisidega nagu IATA ja kombineerida neid täiendava teabega, näiteks sellisega, mis on saadud naha sensibiliseerimise kahjuliku toime raja teisi olulisi etappe käsitlevatest *in vitro* katsetest, ning kasutada peale katsemeetodite ka muid meetodeid, sealhulgas võrdlemist kemikaali analoogidega.

Käesolevat katsemeetodit saab kasutada kombinatsioonis muu täiendava teabega, et aidata eristada naha sensibilisaatoreid (st ÜRO GHSi / CLP-määruse 1. kategooria) nahka mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest ühtse lähenemisviisi kontekstis. Seda meetodit ei saa kasutada eraldivõetuna, sellega ei saa kategoriseerida naha sensibilisaatoreid ÜRO GHSis / CLP-määruses määratletud alamkategooriatesse 1A ja 1B ega prognoosida toime tugevust ohutushindamisega seotud otsuste tegemiseks. Sõltuvalt õigusraamistikust võib eraldivõetuna siiski kasutada DPRA positiivset tulemust kemikaali klassifitseerimiseks ÜRO GHSi / CLP-määruse 1. kategooriasse.

DPRA katsemeetod on osutunud ülekantavaks laboritesse, kes on kogenud kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) analüüsi alal. Prognooside korratavuse tase, mida võib selle katsemeetodi puhul eeldada, on ligikaudu 85 % laborisisese ja 80 % laboritevahelise korratavuse puhul (10). Sellest valideerimisuuringust saadud (18) ja kõigist avaldatud uuringute tulemustest kokku (19) nähtub, et LLNA tulemustega võrreldes on DPRA puhul sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi /CLP-määruse 1. kategooria kemikaalide) mittesensibiliseerivatest kemikaalidest eristamise täpsus 80 % (N = 157), tundlikkus 80 % (88/109-st) ja spetsiifilisus 77 % (37/48-st). DPRA meetodiga on tõenäosem alaprognoosida nõrga kuni mõõduka nahasensibiliseerimise potentsiaaliga kemikaale (st ÜRO GHSi / CLP-määruse alamkategooria 1B) kui kemikaale, millel on tugev nahka sensibiliseeriv toime (st ÜRO GHSi/CLP-määruse alamkategooria 1A) (18, 19). Ainsa katsemeetodina kasutatava DPRA täpsuse väärtused on siinkohal siiski vaid näitlikud, sest katsemeetodit tuleb kohaldada ühtse lähenemisviisi kontekstis kombinatsioonis muudest allikatest pärit teabega ja kooskõlas eespool punktis 9 esitatud nõuetega. Kui hinnatakse naha sensibiliseerimise katsemeetodeid, milles ei kasutata katseloomi, tuleb lisaks arvestada sellega, et LLNA nagu ka muud loomkatsed ei pruugi täielikult peegeldada kemikaali tegelikku toimet huvipakkuva liigi, s.o inimese puhul. Kogu olemasoleva teabe põhjal on tõendatud, et DPRA on kohaldatav paljude uuritavate kemikaalide puhul, millel on erinevad orgaanilised funktsionaalrühmad, toimemehhanismid, erinev nahka sensibiliseeriva toime tugevus (*in vivo* katsetes määratuna) ja erinevad füüsikalis-keemilised omadused (8–10, 19). Kokkuvõttes nähtub sellest teabest, et DPRA on kasulik meetod, mis aitab kindlaks teha naha sensibiliseerimise ohtu.

▼M7

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse terminit „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava terminina ja see ei ole seotud DPRA kohaldatavusega ainete ja/või segude uurimiseks. See katsemeetod ei ole kohaldatav metalliühendite testimiseks, sest teadaolevalt reageerivad need valkudega muude mehhanismide kaudu kui kovalentne sidumine. Uuritav kemikaal peab olema lahustuv asjakohases lahustis lõppkontsentratsioonini 100 mM (vt punkt 18). Uuritavaid kemikaale, mis ei ole sellel kontsentratsioonil lahustuvad, võib siiski uurida väiksemal kontsentratsioonil, millel kemikaal lahustub. Sel juhul võib positiivset tulemust siiski kasutada, et määrata uuritav kemikaal naha sensibilisaatoriks, kuid negatiivse tulemuse korral ei saa teha kindlaid järeldusi reaktsioonivõime puudumise kohta. DPRA kohaldatavusest teadaoleva koostisega segudele on praegu vähe andmeid (18, 19). DPRA meetodit käsitatakse sellele vaatamata meetodina, mis on tehniliselt kohaldatav mitme koostisosaga ainete ja teadaoleva koostisega segude testimiseks (vt punkt 18). Enne kui kasutada käesolevat meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist. Praegust prognoosimudelit ei saa kasutada tundmatu koostisega kompleksete segude või tundmatu või muutuva koostisega ainete, kompleksete reaktsioonisaaduste või bioloogilist päritolu materjalide (st *unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials*, UCVB) puhul, sest selles katses peab uuritava kemikaali ja peptiidi molaarne suhe olema määratud. Selleks tuleks välja töötada uus gravimeetrilisel meetodil põhinev prognoosimudel. Kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa kasutada muude konkreetsete kemikaalirühmade puhul, ei tohi seda nende konkreetsete kemikaalirühmade puhul kasutada.

Käesolev katsemeetod on *in chemico* meetod, milles ei kasutata metaboolset süsteemi. Selle meetodiga ei ole võimalik määrata kemikaale, mille nahka sensibiliseeriva potentsiaali avaldumiseks on vaja bioaktivatsiooni (st prohapteenid). On näidatud, et mõnel juhul on käesoleva katsemeetodiga õigesti määratud kemikaale, mis muutuvad sensibilisaatoriks pärast abiootilist transformatsiooni (st prehapteenid) (18). Lähtudes eespool kirjeldatust, tuleb selle katsemeetodiga saadud negatiivseid tulemusi tõlgendada esitatud piirangute kontekstis ja seoses ühtse lähenemisviisi raamistiku muudest allikatest pärit teabega. Uuritavad kemikaalid, mis ei seondu peptiidiga kovalentselt, kuid soodustavad selle oksüdeerumist (st tsüsteiini dimerisatsiooni), võivad põhjustada peptiidi sisalduse vähenemise võimalikku ülehindamist, mis võib põhjustada valepositiivseid prognoose ja/või kemikaali määramist suurema reaktsioonivõimega klassi (vt punktid 29 ja 30).

Nagu eespool kirjeldatud, aitab DPRA eristada naha sensibilisaatoreid nahka mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest. Kasutatuna sellistes ühtsetes lähenemisviisides nagu IATA, võib see siiski aidata hinnata ka sensibiliseeriva toime tugevust (11). DPRA tulemuste kasutamiseks toime tugevuse hindamisel on vaja siiski veel täiendavat analüüsi, eelistatavalt inimuuringutest saadud andmetega.

KATSE PÕHIMÕTE

DPRA on *in chemico* meetod, millega määratakse kvantitatiivselt tsüsteiini või lüsiini sisaldavate peptiidide kontsentratsioon pärast 24-tunnilist inkubeerimist uuritava kemikaaliga temperatuuril 25 ± 2,5 °C. Määramise lihtsustamiseks sisaldavad sünteetilised peptiidid fenüülalaniini. Peptiidi suhtelist kontsentratsiooni mõõdetakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades gradientelueerimist ja määramist UV-detektoriga 220 nm juures. Seejärel arvutatakse tsüsteiini ja lüsiini sisaldavate peptiidide sisalduse vähenemise protsendilised väärtused ja kasutatakse neid prognoosimudelis (vt punkt 29), mille alusel on võimalik määrata uuritav kemikaal ühte neljast reaktsioonivõime klassist, mida kasutatakse abivahendina, et eristada sensibilisaatoreid nahka mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest.

▼M7

Enne käesoleval katsemeetodil põhineva meetodi rutiinset kasutamist tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, kasutades 2. liites esitatud pädevuse kontrolli aineid.

KATSE KÄIK

Käesolev katsemeetod põhineb loomkatsetele alternatiivsete meetodite andmebaasi (*DataBase on ALternative Methods*, DB-ALM) DPRA katsemeetodil nr°154 (20), mis vastab EURL ECVAMi koordineeritud valideerimisuuringus kasutatud metoodikale. Käesolevat metoodikat soovitatakse kasutada selle meetodi juurutamisel ja kasutamisel laboris. Järgmiseks kirjeldatakse DPRA põhikomponente ja katse käiku. Kui kasutatakse alternatiivset HLPC süsteemi, tuleb tõendada selle samaväärsust DB-ALM metoodikas kirjeldatud süsteemiga (nt kasutades 2. liites esitatud pädevuse kontrolli aineid).

Tsüsteiini või lüsiini sisaldavate peptiidipreparaatide valmistamine

Põhilahused, milles on tsüsteiini (Ac-RFAA**C**AA-COOH) ja lüsiini (Ac-RFAA**K**AA-COOH) sisaldavad sünteetilised peptiidid, mille puhtus on suurem kui 85 % ja eelistatavalt vahemikus 90–95 %, tuleb valmistada *ex tempore*, vahetult enne uuritava kemikaaliga inkubeerimist. Tsüsteiini sisaldava peptiidi lõppkontsentratsioon fosfaatpuhvris (pH 7,5) peab olema 0,667 mM, samas kui lüsiini sisaldava peptiidi lõppkontsentratsioon peab olema 0,667 mM ammooniumatsetaatpuhvris (pH 10,2). HPLC katseseeria tuleb järjestada nii, et HPLC analüüsi kestus oleks lühem kui 30 tundi. Valideerimisuuringus kasutatud ja käesolevas katsemeetodis kirjeldatud HLPC süsteemi puhul kasutati kuni 26 proovi (mis hõlmavad uuritavat kemikaali, positiivset kontrolli ja asjakohast arvu lahusti kontrolle sõltuvalt katses kasutatud eri lahustitest, iga proovi kohta kasutati kolme paralleelproovi), mis on võimalik analüüsida ühes HLPC katseseerias. Kõikide samas katseseerias analüüsitud paralleelproovide puhul tuleb kasutada tsüsteiini ja lüsiini peptiidide samu põhilahuseid. Enne kasutamist on iga peptiidide partii puhul soovitatav kindlaks teha, et see lahustub korralikult.

Uuritava kemikaali preparaadi valmistamine

Uuritava kemikaali lahustuvust asjakohases lahustis tuleb hinnata enne katse tegemist, järgides lahustamismeetodit, mis on kirjeldatud DB-ALM-i DPRA metoodikas (20). Sobivas lahustis lahustub uuritav kemikaal täielikult. Kuna DPRA meetodis inkubeeritakse uuritavat kemikaali tsüsteiini või lüsiini peptiidide suures ülehulgas, siis peetakse selge lahuse tekke sedastamiseks piisavaks visuaalset kontrolli, veendumaks, et uuritav kemikaal ja kõik selle koostisosad (kui uuritav kemikaal on mitme koostisosaga aine või segu) on lahustunud. Sobivad lahustid on atsetonitriil, vesi, vee ja atsetonitriili segu suhtes 1:1, isopropanool, atsetoon või atsetooni ja atsetonitriili segu suhtes 1:1. Muid lahusteid võib kasutada, kui need ei mõjuta peptiidi stabiilsust, mida jälgitakse võrdluskontrollidega C (st proovid, mis sisaldavad ainult asjakohases lahustis lahustatud peptiidi; vt 3. liide). Kui uuritav kemikaal ei ole üheski neist lahustitest lahustuv, siis tuleb viimase võimalusena üritada lahustada seda 300 µl DMSO-s ja lahjendada saadud lahus 2 700 µl atsetonitriiliga. Kui uuritav kemikaal ei ole ka selles segus lahustuv, tuleb üritada lahustada sama kogus uuritavat kemikaali 1 500 µl DMSO-s ja lahjendada saadud lahus 1 500 µl atsetonitriiliga. Vahetult enne katse tegemist tuleb uuritav kemikaal, mis on valmis kaalutuna klaasnõus, lahustada

▼M7

100 mM lahuse valmistamiseks sobivas lahustis. Segude ja mitme koostisosaga teadaoleva koostisega ainete puhul tuleb puhtus määrata kogu segu või aine kohta, liites selle koostisosade (välja arvatud vesi) osakaalud, et määrata kogu segu/aine näiline molekulmass, võttes arvesse segu iga koostisosa (välja arvatud vesi) molekulmassi ning konkreetset osakaalu. Sel viisil määratud puhtust ja näilist molekulmassi kasutatakse seejärel, et arvutada 100 mM lahuse valmistamiseks vajalik uuritava kemikaali mass. Polümeeride puhul, kui valdavalt esinevat molekulmassi on võimatu määrata, võib 100 mM lahuse valmistamiseks arvesse võtta monomeeri molekulmassi (või polümeeri moodustanud mitmesuguste monomeeride molekulmassist koosnevat näilist molekulmassi). Teadaoleva koostisega segude, mitme koostisosaga ainete või polümeeride uurimisel tuleks kaaluda ka lahjendamata uuritava kemikaali testimist. Vedelike puhul tuleb lahjendamata kemikaali testida sellisena, s.o ilma eelneva lahjenduseta, inkubeerides seda moolisuhtes 1:10 ja 1:50 vastavalt tsüsteiini ja lüsiini peptiididega. Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada maksimaalse lahustatava kontsentratsioonini samas lahustis, mida kasutatakse näiliselt 100 mM lahuse valmistamiseks. Seejärel tuleb seda testida sellisena, s.o ilma täiendava lahjenduseta, inkubeerides seda moolisuhtes 1:10 ja 1:50 vastavalt tsüsteiini ja lüsiini peptiididega. Kooskõlalised tulemused (reageeriv või mittereageeriv) näilise 100 mM lahuse ja lahjendamata kemikaali vahel peaksid võimaldama tulemuse kohta kindla järelduse tegemist.

Positiivse kontrolli, võrdluskontrollide ja koelueerimise kontrollide valmistamine

Kaneelaldehüüdi (CASi nr 104-55-2; toiduainele vastava puhtusastmega ≥ 95 %) kasutatakse positiivse kontrollina (PC) kontsentratsioonis 100 mM, lahustatuna atsetonitriilis. Muid sobivaid positiivseid kontrolle, millega eelistatavalt saavutatakse sisalduse vähenemise keskmise vahemiku väärtused, võib kasutada, kui on olemas varasemate katsete andmed, et tuletada võrreldavad HPLC-seeria nõuetekohasuse kriteeriumid. Lisaks tuleb HPLC-seeriasse lisada võrdluskontrollid (st proovid, milles on ainult asjakohases lahustis lahustatud peptiid) ja neid tuleb kasutada enne analüüsi, et teha kindlaks HPLC süsteemi sobivus (võrdluskontrollid A), võrdluskontrollide stabiilsus ajas (võrdluskontrollid B) ning veendumaks, et uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatav lahusti ei mõjuta peptiidi sisalduse protsendilist vähenemist (võrdluskontrollid C) (vt 3. liide). Iga kemikaali jaoks kasutatakse sobivat võrdluskontrolli, et arvutada peptiidi sisalduse vähenemine selle kemikaali puhul (vt punkt 26). Lisaks peab HPLC-seerias olema koelueerimise kontroll, mis koosneb iga analüüsitava kemikaali puhul ainult uuritavast kemikaalist, et teha kindlaks, kas uuritav kemikaal võib elueeruda koos lüsiini või tsüsteiini sisaldava peptiidiga.

Uuritava kemikaali inkubeerimine tsüsteiini ja lüsiini sisaldavate peptiidide lahustega

Tsüsteiini ja lüsiini sisaldavate peptiidide lahuseid tuleb inkubeerida uuritava kemikaaliga suhtes vastavalt 1:10 ja 1:50 proovi automaatsisestaja klaasist viaalides. Kui kohe pärast uuritava kemikaali lisamist peptiidilahusele täheldatakse sademe teket uuritava kemikaali vähese vesilahustuvuse tõttu, ei saa enam olla kindel, kui palju uuritavat kemikaali jäi peptiidiga reageerimiseks lahusesse. Seepärast võib sellisel juhul positiivset tulemust siiski kasutada, kuid negatiivne tulemus on ebaselge ja seda tuleb tõlgendada asjakohase ettevaatusega (vt punktis 11 esitatud katse tegemise nõuded kemikaali puhul, mis ei lahustu 100 mM kontsentratsioonini). Reaktsioonilahus tuleb jätta pimedasse 25 ± 2,5 °C juurde 24 ± 2 tunniks enne HPLC analüüsi tegemist. Iga uuritavat kemikaali tuleb analüüsida kolme paralleelprooviga mõlema peptiidi kohta. Proove peab enne HPLC analüüsi visuaalselt kontrollima. Kui täheldatakse sadet või faaside eraldumist, võib ettevaatusabinõuna proovida väikesel kiirusel (100–400 g) tsentrifuugimist, et sade jääks viaali põhja, sest suures koguses võib sade HPLC torud või kolonnid ummistada. Kui sademe teket või faaside eraldumist täheldatakse pärast inkubeerimisaja lõppu, võib peptiidide sisalduse vähenemist alahinnata ning negatiivse tulemuse puhul ei saa piisava kindlusega järeldada reaktsioonivõime puudumist.

▼M7

HPLC standardse kalibreerimiskõvera koostamine

Standardne kalibreerimiskõver tuleb koostada nii tsüsteiini kui ka lüsiini sisaldavate peptiidide jaoks. Peptiidide standardlahused valmistatakse 20 % või 25 % atsetonitriili puhverlahuses; tsüsteiini sisaldava peptiidi jaoks kasutatakse fosfaatpuhvrit (pH 7,5) ja lüsiini sisaldava peptiidi jaoks ammooniumatsetaatpuhvrit (pH 10,2). Kasutades peptiidi põhilahuse (0,667 mM) standardlahjenduste sarja, valmistatakse 6 kalibreerimislahust, et katta vahemik 0,534–0,0617 mM. Samuti tuleb standardse kalibreerimiskõvera jaoks lisada ainult lahjenduspuhvrit sisaldav tühiproov. Sobiva kalibreerimiskõvera r^2>0,99.

HPLC ettevalmistus ja analüüs

HPLC süsteemi sobivust tuleb kontrollida enne analüüsi tegemist. Peptiidi sisalduse vähenemist jälgitakse HPLC süsteemiga, mis on ühendatud UV neelduvuse detektoriga (fotodioodrividetektor või fikseeritud lainepikkusega neelduvuse detektor signaaliga lainepikkusel 220 nm). Sobiv kolonn paigaldatakse HPLC süsteemi. Valideeritud metoodikas kirjeldatud HPLC süsteemis kasutatakse eelistatult kolonni Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3,5 mikronit. Selle pöördfaasi-HPLC kolonni kasutamisel tuleb kogu süsteemi tasakaalustada 30 °C juures 50 % faasiga A (0,1 % (mahuprotsent) trifluoroäädikhappe vesilahus) ja 50 % faasiga B (0,085 % (mahuprotsent) trifluoroäädikhappe lahus atsetonitriilis) vähemalt 2 tundi enne analüüsietapi alustamist. HPLC analüüsiks kasutatakse voolukiirust 0,35 ml/min ja lineaarset gradienti 10 %–25 % atsetonitriili 10 minuti jooksul, misjärel suurendatakse muu materjali eemaldamiseks atsetonitriili sisaldus kiiresti 90 %-ni. Iga standardi, proovi ja kontrolli sissesüstimisel tuleb kasutada ühesugust ruumala. Kolonn tuleb iga süstimise vahel algtingimustel 7 minuti jooksul uuesti tasakaalustada. Kui kasutatakse teistsugust pöördfaasi-HPLC kolonni, võib tsüsteiini ja lüsiini sisaldavate peptiidide sobiva elueerimise ning integreerimise tagamiseks olla vajalik kohandada eespool kirjeldatud süsteemi parameetreid, sealhulgas süstitava lahuse ruumala, mis võib sõltuvalt kasutatavast süsteemist erineda (tavaliselt vahemikus 3–10 µl). Kui kasutatakse alternatiivset HLPC süsteemi, on oluline tõendada selle samaväärsust eespool kirjeldatud süsteemiga (nt kasutades 2. liites esitatud pädevuse kontrolli aineid). Neelduvust jälgitakse lainepikkusel 220 nm. Kui kasutatakse fotodioodrivi tüüpi detektorit, määratakse neelduvus lainepikkusel 258 nm. Tuleb märkida, et mõnel atsetonitriili partiil võib olla negatiivne mõju peptiidi stabiilsusele ning seda peab enne uue partii kasutusele võtmist hindama. Koelueerimise näitajana võib kasutada 220 nm ja 258 nm piigialuste pindalade suhet. Kui kontrollproovide suhte keskväärtus ([1]) jääb vahemikku 90–100 %, on see iga proovi puhul usaldusväärne näitaja, et koelueerumist ei ole toimunud.

Mõned uuritavad kemikaalid võivad soodustada tsüsteiini sisaldavate peptiidide oksüdeerumist. Dimeerset tsüsteiini sisaldava peptiidi piik võib olla visuaalselt eristatav. Kui selgub, et on toimunud dimeriseerumine, tuleb silmas pidada, et peptiidi sisalduse vähenemist võib sel juhul ülehinnata, mis põhjustab valepositiivseid prognoose ja/või kemikaali määramist suurema reaktsioonivõimega klassi (vt punktid 29 ja 30).

Tsüsteiini sisaldavate ja lüsiini sisaldavate peptiidide HPLC analüüsi võib läbi viia kas samaaegselt (kui on olemas kaks HPLC süsteemi) või eri päevadel. Kui analüüs tehakse eri päevadel, tuleb kõik uuritava kemikaali lahused mõlema katse jaoks igal päeval värskelt valmistada. Analüüs tuleb ajastada nii, et tagada esimese proovi sisestamine 22–26 tundi pärast uuritava kemikaali segamist peptiidilahusega. HPLC-seeria tuleb järjestada nii, et HPLC analüüsi kestus

([1]) Keskväärtusena mõistetakse kogu dokumendi ulatuses aritmeetilist keskmist.

▼M7

oleks lühem kui 30 tundi. Valideerimisuuringus kasutatud ja käesolevas meetodis kirjeldatud HPLC süsteemi puhul saab ühe HPLC-seeria kohta kasutada 26 analüüsitavat proovi (vt ka punkt 17). HPLC analüüsi seeria näide on esitatud 3. liites.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete hindamine

Tsüsteiini või lüsiini sisaldavate peptiidide kontsentratsioon igas proovis määratakse fotomeetriliselt lainepikkusel 220 nm, mõõtes asjakohaste piikide piigialust pindala (*area under the curve*, AUC) ning arvutades peptiidi kontsentratsiooni, kasutades selleks standarditega saadud lineaarset kalibreerimiskõverat.

Iga proovi kohta määratakse peptiidi sisalduse vähenemine protsentides, selleks mõõdetakse piigialune pindala ja jagatakse see asjakohase võrdluskontrolli C piigialuse pindala keskväärtusega (vt 3. liide) vastavalt allpool kirjeldatud valemile.

$$Petiidi\ sisalduse\ v\ddot{a}henemine\ (\%) = \left[1 - \left(\frac{peptiidi\ piigialune\ pindala\ kordussüstimisel}{eskmine\ peptiidi\ piigialune\ pindala\ võrdluskontrollides\ C}\right)\right] \times 100$$

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Analüüs loetakse nõuetekohaseks, kui on täidetud järgmised kriteeriumid:

a) standardse kalibreerimiskõvera r^2>0,99;

b) kolme paralleelproovi peptiidide sisalduse vähenemise protsendi keskväärtus positiivse kontrollina kasutatava kaneelaldehüüdi puhul peab olema vahemikus 60,8–100 % tsüsteiini sisaldava peptiidi puhul ja vahemikus 40,2–69,0 % lüsiini sisaldava peptiidi puhul ning positiivse kontrolli paralleelproovide maksimaalne standardhälve (*standard deviation*, SD) on tsüsteiini sisaldava peptiidi sisalduse vähenemise protsendi puhul <14,9 % ja lüsiini sisaldava peptiidi sisalduse vähenemise protsendi puhul <11,6 %;

c) võrdluskontrollide (A) peptiidi kontsentratsiooni keskväärtus peab jääma vahemikku 0,50 ± 0,05 mM ning atsetonitriili lahuses oleva üheksa kontrolli (B ja C) piigialuste pindalade variatsioonikordaja (*coefficient of variation*, CV) peab olema < 15,0 %.

Kui üks nendest kriteeriumidest on täitmata, tuleb analüüsi korrata.

Järgmised kriteeriumid peavad olema täidetud, et uuritava kemikaaliga saadud tulemusi saaks käsitada kehtivana:

a) uuritava kemikaali paralleelproovide maksimaalne standardhälve peab olema tsüsteiini sisalduse protsendilise vähenemise korral < 14,9 % ja lüsiini sisalduse protsendilise vähenemise korral < 11,6 %;

b) kolme võrdluskontrolli C peptiidi kontsentratsiooni keskväärtus peab olema 0,50 ± 0,05 mM. Kui need kriteeriumid ei ole täidetud, tuleb saadud tulemused lugeda kehtetuks ning selle konkreetse kemikaali analüüsi uuesti korrata.

Prognoosimudel

Iga uuritava kemikaali kohta arvutatakse tsüsteiini sisalduse ja lüsiini sisalduse protsendilise vähenemise keskväärtus. Negatiivset vähenemise tulemust käsitatakse keskväärtuse arvutamisel nullina. Kasutades prognoosimudelit tsüsteiin 1:10 / lüsiin 1:50, mis on esitatud tabelis 1, tuleb ühtse lähenemisviisi raamistikus naha sensibilisaatorite ja nahka mitte sensibiliseerivate kemikaalide eristamiseks kasutada läviväärtusena peptiidi sisalduse vähenemise keskmist protsenti 6,38 %. Ühtse lähenemisviisi raamistikus võib uuritava kemikaali reaktsioonivõime klassi (st nõrk, mõõdukas ja tugev reaktsioonivõime) määramisel osutuda kasulikuks prognoosimudeli rakendamine. Prognoosimudeli rakendamisel uuritava kemikaali reaktsioonivõime klassi (st nõrk, mõõdukas, tugev reaktsioonivõime) määramiseks võib saada kasulikku teavet, millest juhinduda reaktsioonivõime hindamisel ühtse lähenemisviisi raamistikus.

▼M7

Tabel 1

Prognoosimudel tsüsteiin 1:10 / lüsiin 1:50 ([1])

Tsüsteiini ja lüsiini sisalduse vähenemise % keskväärtus	Reaktsioonivõime klass	DPRA prognoos ([2])
0 % ≤ sisalduse vähenemise % keskväärtus ≤ 6,38 %	Puuduv või minimaalne reaktsioonivõime	Negatiivne
6,38 % < sisalduse vähenemise % keskväärtus ≤ 22,62 %	Nõrk reaktsioonivõime	Positiivne
22,62 % < sisalduse vähenemise % keskväärtus ≤ 42,47 %	Mõõdukas reaktsioonivõime	
42,47 % < sisalduse vähenemise % keskväärtus ≤ 100 %	Tugev reaktsioonivõime	

([1]) Arvud viitavad statistiliselt tuletatud läviväärtustele ja ei ole seotud mõõtmise täpsusega.
([2]) DPRA prognoosi tuleb arvesse võtta ühtse lähenemisviisi raamistikus ning kooskõlas punkti 9 ja 12 nõuetega.

Võib esineda juhte, kus uuritaval kemikaalil (ainel või ühest või mitmest koostisosast koosneva aine või segu mõnel koostisosal) on lainepikkusel 220 nm oluline neelduvus ning peptiidiga ühesugune retentsiooniaeg (elueeruvad koos). Koelueerumise võib kõrvaldada, kui vähesel määral kohandada HPLC süsteemi nii, et paremini lahutada uuritava kemikaali elueerimise aega peptiidi elueerimise ajast. Kui koelueerimise vältimiseks kasutatakse alternatiivset HLPC süsteemi, tuleb tõendada selle samaväärsust valideeritud süsteemiga (nt kasutades 2. liites esitatud pädevuse kontrolli aineid). Kui esineb koelueerimine, ei saa peptiidi piiki integreerida ning on võimatu arvutada peptiidi sisalduse vähenemise protsenti. Kui sellised uuritavad kemikaalid elueeruvad koos nii tsüsteiini sisaldavate kui ka lüsiini sisaldavate peptiididega, tuleb analüüsi tulemus lugeda ebaselgeks. Kui uuritav kemikaal elueerub ainult koos lüsiini sisaldava peptiidiga, siis võib kasutada tabelis 2 esitatud prognoosimudelit tsüsteiin 1:10.

Tabel 2

Prognoosimudel tsüsteiin 1:10 ([1])

Tsüsteiini (*Cys*) sisalduse vähenemise %	Reaktsioonivõime klass	DPRA prognoos ([2])
0 % ≤ tsüsteiini sisalduse vähenemise % ≤ 13,89 %	Puuduv või minimaalne reaktsioonivõime	Negatiivne
13,89 % < tsüsteiini sisalduse vähenemise % ≤ 23,09 %	Nõrk reaktsioonivõime	Positiivne
23,09 % < tsüsteiini sisalduse vähenemise % ≤ 98,24 %	Mõõdukas reaktsioonivõime	
98,24 % < tsüsteiini sisalduse vähenemise % ≤ 100 %	Tugev reaktsioonivõime	

([1]) Arvud viitavad statistiliselt tuletatud läviväärtustele ja ei ole seotud mõõtmise täpsusega.
([2]) DPRA prognoosi tuleb arvesse võtta ühtse lähenemisviisi raamistikus ning kooskõlas punkti 9 ja 12 nõuetega.

Võib esineda muid juhte, kui uuritava kemikaali ja emma-kumma peptiidi retentsiooniaja kattumine ei ole täielik. Sellistel juhtudel võib peptiidi protsendilise sisalduse vähenemise väärtusi hinnata ning kasutada prognoosimudelit tsüsteiin 1:10 / lüsiin 1:50, kuid uuritava kemikaali reaktsioonivõime klassi ei saa täpselt määrata.

▼M7

Nii lüsiini kui ka tsüsteiini puhul peaks uuritava kemikaali kohta piisama ühest HPLC analüüsist, kui tulemus on selge. Kui tulemused on lähedal läviväärtusele, millega eristatakse positiivseid tulemusi negatiivsetest (st piiripealsed tulemused), võib siiski vaja minna täiendavat testimist. Kui esineb olukordi, milles prognoosimudeli tsüsteiin 1:10 / lüsiin 1:50 korral jääb keskmine sisalduse vähenemise protsent vahemikku 3–10 % või prognoosimudeli tsüsteiin 1:10 korral jääb tsüsteiini sisalduse vähenemise protsent vahemikku 9–17 %, kaalutakse teise katseseeria tegemist, ning juhul, kui selle tulemused erinevad esimesest seeriast, tuleb teha ka kolmas seeria.

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

Uuritav kemikaal

— Ühe koostisosaga aine

  — Kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;

  — füüsiline välimus, lahustuvus vees, molekulmass ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;

  — puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

  — uuritava kemikaali töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

  — uuritud kontsentratsioon(id);

  — säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;

— Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, komplekssed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:

  — kirjeldatakse nii palju kui võimalik, lähtudes koostisosade keemilistest identifitseerimisandmetest (vt eespool), puhtusest, kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;

  — välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;

  — molekulmass või näiline molekulmass teadaoleva koostisega segude/polümeeride korral või muu uuringu tegemiseks asjakohane teave;

  — uuritava kemikaali töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

  — uuritud kontsentratsioon(id);

  — säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;

Kontrollid

— Positiivne kontroll

  — Kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;

  — füüsiline välimus, lahustuvus vees, molekulmass ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;

  — puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

▼M7

— kontrolli kemikaali töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

— uuritud kontsentratsioon(id);

— säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;

— viide varasematele positiivse kontrolli tulemustele, mis tõendavad sobivaid analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriume, kui asjakohane.

— Lahusti/vehiikul

— Kasutatud lahusti/vehiikul ja selle koostisosade suhe, kui asjakohane;

— kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid ja/või muud identifikaatorid;

— puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

— füüsiline välimus, molekulmass ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused juhul, kui kasutatakse muid lahusteid/vehiikuleid kui need, mida on katsemeetodis nimetatud, kättesaadavas ulatuses;

— säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti valimise põhjendus;

— atsetonitriili puhul uuring, kuidas see mõjub peptiidi stabiilsusele.

Peptiidide, positiivsete kontrollide ja uuritava kemikaali preparaatide valmistamine

— Peptiidilahuste kirjeldus (tarnija, partii, peptiidi täpne mass, põhilahusele lisatud ruumala);

— positiivse kontrolli lahuse kirjeldus (positiivse kontrolli aine täpne mass, katselahusele lisatud ruumala);

— uuritava kemikaali lahuste kirjeldus (uuritava kemikaali täpne mass, katselahusele lisatud ruumala);

HPLC seadmed ja analüüs

— HPLC seadme tüüp, HPLC analüütiline kolonn ja eelkolonn, detektor, proovi automaatsisestaja;

— HPLC analüüsi jaoks asjakohased parameetrid, nagu kolonni temperatuur, süstimisruumala, voolukiirus ja gradient.

Süsteemi sobivus

— Iga standardproovi ja võrdluskontrolli A paralleelproovi korral peptiidipiigi alune pindala lainepikkusel 220 nm;

— lineaarse kalibreerimiskõvera graafik ja r^2 väärtus;

— peptiidi kontsentratsioon iga võrdluskontrolli A paralleelproovi korral;

— kolme võrdluskontrolli A korral peptiidi kontsentratsiooni keskväärtus (mM), SD ja CV;

— peptiidi kontsentratsioon võrdluskontrollide A ja C korral.

▼M7

Analüüsiseeria

— Võrdluskontrolli kohta:

  — iga võrdluskontrolli B ja C paralleelproovi peptiidipiigi alune pindala lainepikkusel 220 nm;

  — atsetonitriilis lahustatud üheksa võrdluskontrolli B ja C korral peptiidipiigi aluse pindala keskväärtus lainepikkusel 220 nm, SD ja CV (selleks, et tõendada võrdluskontrollide stabiilsust analüüsi jooksul);

  — iga kasutatud lahusti kohta kolme asjakohase võrdluskontrolli C korral peptiidipiigi aluse pindala keskväärtus lainepikkusel 220 nm (peptiidi sisalduse vähenemise protsendi arvutamiseks);

  — iga kasutatud lahusti kohta kolme asjakohase võrdluskontrolli C korral peptiidi kontsentratsioon (mM);

  — iga kasutatud lahusti kohta kolme asjakohase võrdluskontrolli C korral peptiidi kontsentratsiooni keskväärtus (mM), SD ja CV.

— Positiivse kontrolli kohta:

  — iga paralleelproovi peptiidipiigi alune pindala lainepikkusel 220 nm;

  — iga paralleelproovi peptiidi sisalduse vähenemise protsent;

  — kolme paralleelproovi peptiidi sisalduse vähenemise protsendi keskväärtus, SD ja CV.

— Iga uuritava kemikaali kohta:

  — sademe tekkimine reaktsioonisegus inkubeerimisaja lõpus, kui tähelda-takse; kas sade lahustati uuesti või tsentrifuugiti;

  — koelueerimise esinemine;

  — muude asjakohaste vaatlusandmete kirjeldus, kui asjakohane;

  — iga paralleelproovi peptiidipiigi alune pindala lainepikkusel 220 nm;

  — iga paralleelproovi peptiidi sisalduse vähenemise protsent;

  — kolme paralleelproovi peptiidi sisalduse vähenemise protsendi keskväärtus, SD ja CV;

  — tsüsteiini ja lüsiini sisalduse vähenemise protsendi keskväärtused;

  — kasutatud prognoosimudel ja DPRA prognoos.

Tasemekatsed

— Kui see on asjakohane, esitage labori katsemeetodi tegemise pädevuse tõen-damiseks kasutatud meetod (nt pädevuse kontrolli ainetega katsetamine) või meetod, millega tõendatakse katsemeetodi toimivuse korratavust ajas.

Tulemuste arutelu

— DPRA katsega saadud tulemuste arutelu;

— katsemeetodiga saadud tulemuste arutelu ühtse lähenemisviisi kontekstis, kui on olemas muud asjakohast teavet.

Järeldus

▼**M7**

KIRJANDUS

(1) United Nations (UN) (2013), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Kättesaadav aadressil: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OECD (2012), „The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence“, *Series on Testing and Assessment*, No. 168, OECD, Paris.

(3) Käesoleva lisa peatükk B.6, „Naha sensibiliseerimine“,

(4) Käesoleva lisa peatükk B.42, „Lokaalsete lümfisõlmede katse“

(5) Käesoleva lisa peatükk B.50: „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse: DA“.

(6) Käesoleva lisa peatükk B.51, „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse BrdU-ELISA meetodil“.

(7) Adler *et al.* (2011), „Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010“, *Archives of Toxicology*, Vol. 85: 367–485.

(8) Gerberick *et al.* (2004), „Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens“, *Toxicological Sciences* 81: 332–343.

(9) Gerberick *et al.* (2007), „Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach“, *Toxicological Sciences* 97: 417–427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013), „Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing“. Kättesaadav aadressil: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013), „Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice“, *Journal of Applied Toxicology*, avaldatud internetis, 14. mai 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al.* (2012), „Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential“, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489–504.

(13) Nukada *et al.* (2013), „Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals“, *Toxicology in Vitro* 27: 609-618.

(14) Ball *et al.* (2011), „Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach“, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60: 389–400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936), „Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds“, *Journal of Immunological Methods* 64: 625–639.

(16) Dupuis and Benezra (1982), *Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach*, New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998), *Allergic contact dermatitis: the molecular basis.* Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012), „Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report“, 74 pp. Kättesaadav aadressil: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

(19) Natsch *et al.* (2013), „A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation“, *Journal of Applied Toxicology*, avaldatud internetis, 9. aprill 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) „DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing“, 17 pp. Kättesaadav aadressil: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OECD (2005), „Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, *Series on Testing and Assessment* No. 34, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001), „Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation“, 22 pp. Kättesaadav aadressil: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138

(23) ICCVAM (2003), „Contact sensitization: Classification according to potency“, European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

1. liide

MÕISTED

Aine – keemilised elemendid ja nende ühendid, kas looduslikud või tootmisprotsessiga saadud, sealhulgas neis sisalduvad toote stabiliseerimiseks vajalikud lisaained või tootmisprotsessist tulenevad lisandid, välja arvatud lahusti, mida on võimalik eraldada aine stabiilsust mõjutamata ja selle koostist muutmata (1).

Asjakohasus – huvipakkuva toime ja katse vahelise seose kirjeldus, millest nähtub, kas see seos on tähenduslik ning kasulik konkreetse eesmärgi puhul. See on ulatus, mille piires saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasusega seoses võetakse arvesse ka katsemeetodi täpsust (kordustäpsust) (21).

Kahjuliku toime rada (*Adverse Outcome Pathway*, AOP) – sündmuste ahel alates sihtkemikaali või sarnaste kemikaalide rühma keemilisest struktuurist molekulaarse initsieerimisetapi kaudu vaadeldava toime kliinilise avaldumiseni *in vivo* (2).

Kalibreerimiskõver – seos katses saadud toime väärtuse ja aine teadaoleva analüütilise kontsentratsiooni vahel (nimetatakse ka *standardkõveraks*).

Katsete tegemist ja hindamist käsitlev ühtne lähenemisviis (*Integrated Approach to Testing and Assessment*, IATA; lühendatult „ühtne lähenemisviis“) – struktureeritud lähenemisviis, mida kasutatakse kemikaali või kemikaalide rühma ohutegurite tuvastamiseks (võimalikkus), selle kirjeldamiseks (toime tugevus) ja/või ohutuse hindamiseks (võimalikkus / toime tugevus ja kokkupuude) ja millega ühendatakse strateegiliselt ning analüüsitakse kõik asjakohased andmed, et oleks olemas vajalik teave regulatiivse meetme võtmiseks seoses võimaliku ohu ja/või riskiga ja/või täiendavaks sihipäraseks (ja seega minimaalseks) katsetamiseks.

Kemikaal – aine või segu.

Korratavus – sama kemikaali sama metoodikaga uurimisel saadud tulemuste kokkulangevus (vt usaldusväärsus) (21).

Mitme koostisosaga aine – aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles on rohkem kui üks põhikoostisosa, mille kontsentratsioon on vahemikus 10 %–80 % (massiprotsent). Mitme koostisosaga aine saadakse tootmisprotsessi käigus. Erinevus segu ja mitme koostisosaga aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosaga aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

Molekulaarne initsieerimisetapp – bioloogilise süsteemi molekulaarsel tasandil häirumine, mis on tekitatud kemikaali poolt ja mis on tuvastatud kui kahjuliku toime raja algetapp.

Ohtlikkus – mõjuri või olukorra iseloomulik omadus, mis võib põhjustada kahjulikku toimet, kui organism, süsteem või (alam-)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida töödeldakse ainega, mis teadaolevalt kutsub esile positiivse toime. Selleks et oleks võimalik hinnata positiivse kontrolli kemikaali tekitatud toime muutumist ajas, ei tohi positiivne toime olla liiga tugev.

Segu – ainete segu või lahus, mis koosneb kahest või enamast ainest, mis omavahel ei reageeri (1).

Spetsiifilisus – kõikide negatiivsete/inaktiivsete kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega mõõdetakse katsemeetodi

▼M7

täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (21).

Süsteemi sobivus – etalonainega enne katseseeria analüüside tegemist kindlaks määratud seadme toimivus (nt tundlikkus) (22).

Tundlikkus – kõigi positiivsete/reaktsioonivõimeliste kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega mõõdetakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (21).

Täpsus – näitab katsemeetodi tulemuste lähedust kokkulangemisele kinnitatud võrdlusväärtustega (mõõtetäpsus). Täpsusega mõõdetakse katsemeetodi toimivust ja see on üks asjakohasuse aspektidest. Terminit kasutatakse ka kordustäpsuse tähenduses, mis näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (21).

Usaldusväärsus – katsemeetodiga aja jooksul saadud tulemuste laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ulatuse mõõt, kui katset tehakse sama metoodikaga. Seda hinnatakse laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ja laborisisese korduvuse arvutamisega (21).

Uuritav kemikaal – terminit „uuritav kemikaal“ kasutatakse katseobjekti kohta.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega ained, komplekssed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid.

Valiidne katsemeetod: katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul käsitatakse piisavana ning mis põhineb teaduslikult tõendatud põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi valiidne absoluutses tähenduses, vaid ainult seoses määratud eesmärgiga (21).

Variatsioonikordaja – hajuvuse mõõt, mis arvutatakse paralleelandmete rühma kohta; selleks jagatakse standardhälve keskväärtusega. Seda saab väljendada protsentides, kui korrutada tulemus sajaga.

Võrdluskontroll – uuritava kemikaaliga töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või vehiikulit, ja mida käideldakse samamoodi kui uuritava kemikaaliga töödeldud proovi ja muude kontrollide proove, et määrata lähtetase, mille suhtes tuleb arvutada samas lahustis või vehiikulis lahustatud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide tekitatud reaktsiooni lähtetaseme väärtus. Kui seda proovi uuritakse paralleelselt negatiivse kontrolli prooviga, siis näitab see, kas lahusti või vehiikul interakteerub katsesüsteemiga.

Ühe koostisosaga aine – aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles on üks põhikoostisosa, mille kontsentratsioon on vähemalt 80 % (massiprotsent).

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS (*United Nations Globally Harmonized System*, UN GHS)) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ained ja segud) klassifitseerimine füüsikaliste ohutegurite ning tervise- ja keskkonnaohu standarditud tüübi ja -taseme alusel ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, mille eesmärk on edastada teavet kemikaalide kahjulikest toimetest, et kaitsta inimesi (sealhulgas tööandjaid, töötajaid, vedajaid, tarbijaid ja päästetöötajaid) ning keskkonda (1).

▼M7

2. liide

PÄDEVUSE KONTROLLI AINED

Naha sensibiliseerimine *in chemico*: otsene reaktsioonivõime katse peptiididega

Enne käesoleva katsemeetodi rutiinset kasutamist tuleb laboritel tõendada oma tehnilist pädevust, kasutades selleks kümmet tabelis 1 soovitatud pädevuse kontrolli ainet, et saada nendega õige eeldatav DPRA prognoos ning tsüsteiini ja lüsiini sisalduse vähenemise väärtused, mis kummagi peptiidi puhul jäävad asjakohasesse võrdlusvahemikku kaheksa pädevuse kontrolli aine puhul kümnest. Pädevuse kontrolli ained on valitud nii, et need esindaksid naha sensibiliseerimise ohuga seotud eri reaktsioone. Muud valiku kriteeriumid olid, et need ained on kaubanduslikult kättesaadavad, on olemas kõrgekvaliteedilised *in vivo* võrdlusandmed ning kõrgekvaliteedilised DPRA katsemeetodiga *in vitro* saadud andmed, mida on kasutatud EURL ECVAM-i koordineeritud valideerimisuuringus, et tõendada katsemeetodi edukat rakendamist selles uuringus osalenud laborites.

Tabel 1

Soovitatavad pädevuse kontrolli ained DPRA katse tegemise tehnilise pädevuse tõendamiseks

Pädevuse kontrolli ained	CASi nr	Füüsikaline olek	*In vivo* toime prognoos (1)	DPRA prognoos (2)	Tsüsteiini sisalduse vähenemise protsendiline vahemik (3)	Lüsiini sisalduse vähenemise protsendiline vahemik (3)
2,4-dinitroklorobenseen	97-00-7	Tahke	Sensibilisaator (äärmiselt tugev)	Positiivne	90–100	15–45
Oksasoloon	15646-46-5	Tahke	Sensibilisaator (äärmiselt tugev)	Positiivne	60–80	10–55
Formaldehüüd	50-00-0	Vedelik	Sensibilisaator (tugev)	Positiivne	30–60	0–24
Bensülideenatsetoon	122-57-6	Tahke	Sensibilisaator (mõõdukas)	Positiivne	80–100	0–7
Farnesaal	19317-11-4	Vedelik	Sensibilisaator (nõrk)	Positiivne	15–55	0–25
2,3-butaandioon	431-03-8	Vedelik	Sensibilisaator (nõrk)	Positiivne	60–100	10–45
1-butanool	71-36-3	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	0–7	0-5,5
6-metüülkumariin	92-48-8	Tahke	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	0–7	0-5,5
Piimhape	50-21-5	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	0–7	0–5,5
4-metoksüatseto-fenoon	100-06-1	Tahke	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	0–7	0–5,5

(1) *In vivo* ohu ja (toime tugevuse) prognoosid põhinevad LLNA andmetel (19). Toime tugevus *in vivo* on tuletatud, kasutades ECETOC-i ette nähtud kriteeriume (23).
(2) DPRA prognoosi tuleb arvesse võtta ühtse lähenemisviisi raamistiku kontekstis ja kooskõlas punktide 9 ja 11 nõuetega.
(3) Vahemikud, mis on määratud kuues sõltumatus laboris saadud vähemalt kümne sisalduse vähenemise väärtuse alusel.

▼M7

3. liide

HPLC ANALÜÜSI JÄRJESTUSE NÄIDE

Kalibreerimisstandardid ja võrdluskontrollid	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Lahjenduspuhver Võrdluskontroll A, 1. paralleelproov Võrdluskontroll A, 2. paralleelproov Võrdluskontroll A, 3. paralleelproov
Koelueerumise kontrollid	Koelueerumise 1. kontroll, esimene uuritav kemikaal Koelueerumise 2. kontroll, teine uuritav kemikaal
Võrdluskontrollid:	Võrdluskontroll B, 1. paralleelproov Võrdluskontroll B, 2. paralleelproov Võrdluskontroll B, 3. paralleelproov
Esimene paralleelproovide komplekt:	Võrdluskontroll C, 1. paralleelproov Kaneelaldehüüd, 1. paralleelproov 1. proov, 1. paralleelproov 2. proov, 1. paralleelproov
Teine paralleelproovide komplekt:	Võrdluskontroll C, 2. paralleelproov Kaneelaldehüüd, 2. paralleelproov 1. proov, 2. paralleelproov 2. proov, 2. paralleelproov
Kolmas paralleelproovide komplekt:	Võrdluskontroll C, 3. paralleelproov Kaneelaldehüüd, 3. paralleelproov 1. proov, 3. paralleelproov 2. proov, 3. paralleelproov
Võrdluskontrollid:	Võrdluskontroll B, 4. paralleelproov Võrdluskontroll B, 5. paralleelproov Võrdluskontroll B, 6. paralleelproov

Analüüsi järjestuses tuleb kasutada kolme võrdluskontrollide (st proovid, mis koosnevad ainult asjakohases lahustis lahustatud peptiidist) komplekti.
Võrdluskontroll A: kasutatakse, et kontrollida HPLC süsteemi sobivust.
Võrdluskontroll B: lisatakse analüüside seeria alguses ja lõpus, et kontrollida võrdluskontrollide stabiilsust analüüsiks kulunud aja jooksul.
Võrdluskontroll C: lisatakse analüüside seeriasse eesmärgiga kontrollida, et uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahusti ei mõjuta peptiidi sisalduse vähenemise protsenti.

▼M7

B.60. NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN VITRO*: ARE-NRF2 LUTSIFERAASI KATSEMEETOD

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 442D (2015). Naha sensibilisaator on aine, mis põhjustab nahaga kokkupuutel allergilise reaktsiooni, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (ÜRO GHS) (1) ja Euroopa Liidu määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus) ([1]). Käesolevas katsemee todis kirjeldatakse *in vitro* meetodit (ARE-Nrf2 lutsiferaasi katsemeetod, *ARE-Nrf2 luciferase assay)*), mis aitab eristada naha sensibilisaatoreid nahka mitte sensibiliseerivatest ainetest kooskõlas ÜRO GHSi (1) ja CLP-määrusega.

Naha sensibiliseerumise oluliste bioloogiliste etappide suhtes on olemas ühisarusaam. Olemasolev teave naha sensibiliseerimisega seotud keemiliste ja bioloogiliste mehhanismide kohta on kokku võetud kahjuliku toime raja (*Adverse Outcome Pathway*, AOP) käsitluses (2), milles kirjeldatakse kõiki etappe alates protsessi käivitavast molekulaarsest etapist vahestaadiumide kaudu kuni tervisele kahjuliku toimeni, st allergilise kontaktdermatiidini inimeste puhul või kontaktüpersensitiivsuseni närilistel (2, 3). Käivitavaks molekulaarse tasandi etapiks on elektrofiilsete ainete kovalentne sidumine naha valkude nukleofiilsete tsentritega. Kahjuliku toime raja teine oluline etapp toimub keratinotsüütides ning hõlmab nii põletikureaktsioone kui ka selliste geenide avaldumist, mis on seotud spetsiifiliste signaaliülekanderadadega, nagu antioksüdatiivse/elektrofiilse reaktsiooni elemendist (*antioxidant/electrophile response element*, ARE) sõltuvad rajad. Kolmas oluline etapp on dendriitrakkude aktiveerimine, mida hinnatakse tavaliselt spetsiifiliste raku pinnamarkerite kemokiinide ja tsütokiinide avaldumise alusel. Neljas oluline etapp on T-rakkude paljunemine, mida hinnatakse kaudselt hiire lokaalsete lümfisõlmede katses (4).

Nahka sensibiliseeriva toime hindamiseks on tavaliselt kasutatud katseloomi. Merisigu kasutatakse klassikalistes meetodites, nagu Magnussoni ja Kligmani meetodil merisea maksimeeritud nahaärritustest (*Guinea Pig Maximisation Test*, GMPT) ja Buehleri katse (katsemeetod B.6 (5)), millega uuritakse nii naha sensibiliseerimise induktsiooni- kui ka avaldumisfaasi. Kõigi hiirtega läbiviidavate katsetega, s.o lokaalsete lümfisõlmede katse (*Local Lymph Node Assay*, LLNA, katsemeetod B.42 (4)) ja selle kahe radioaktiivse märgistuseta modifikatsiooni puhul (LLNA: DA (katsemeetod B.50 (6)) ja LLNA: BrdU-ELISA (katsemeetod B.51 (7)), hinnatakse ainult induktsioonina avalduvat toime, kuid need on samuti heaks kiidetud, sest loomade heaolu seisukohast on neil eeliseid võrreldes merisigade kasutamisega katsetes, ja nende kaudu saab naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi objektiivselt mõõta.

Hiljuti on mehhanistlikul käsitlusel põhinevad *in chemico* ja *in vitro* katsemeetodid arvatud teaduslikult põhjendatuiks kemikaalidest tuleneva naha sensibiliseerimise ohu hindamiseks. Kuna igas loomadeta tehtavas katses (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) on kahjuliku toime raja käsitlus piiratud ja mehhanistlik (2, 3), on vaja katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, IATA, edaspidi „ühtne lähenemisviis“) raames katseid kombineerida, et saaks täielikult loobuda praegu kasutatavatest loomkatsetest.

Käesolev katsemeetod (ARE-Nrf2 lutsiferaasi katse) on ette nähtud 2. punktis selgitatud teise olulise etapi uurimiseks. Naha sensibilisaatorite kohta on avaldatud, et nad käivitavad geene, mida reguleerib antioksüdatiivse reaktsiooni element (ARE) (8, 9). Väikesed elektrofiilsed ained nagu naha sensibilisaatorid võivad mõjutada sensorvalku KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), näiteks selle tsüsteiinijäägi kovalentse modifitseerimise kaudu, mistõttu valk ja

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼M7

transkriptsioonifaktor Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*) dissotsieeruvad. Dissotsieerunud Nrf2 võib seejärel aktiveerida ARE-sõltuvaid geene, näiteks neid, mis kodeerivad II faasi detoksifitseerivaid ensüüme (8, 10, 11).

Praegu on KeratinoSens™ test ainuke käesoleval meetodil põhinev *in vitro* ARE-Nrf2 lutsiferaasi katse, mille valideerimisuuringud on lõpetatud (9, 12, 13), misjärel on sõltumatu vastastikuse hindamise läbi viinud Euroopa Alternatiivsete Meetodite Tõestamise Keskuse Euroopa Liidu referentlabor (EURL ECVAM) (14). Teaduslikult põhjendatuks loeti KeratinoSens™ testi kasutamine ühtse lähenemisviisi osana, et aidata eristada naha sensibilisaatoreid nahka mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest ohu klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil (14). Laborid, kes soovivad seda katsemeetodit rakendada, võivad saada KeratinoSens™ testis kasutatud rekombinantse rakuliini, sõlmides litsentsilepingu selle katsemeetodi väljatöötajaga (15).

Mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED, KASUTATAVUS JA PIIRANGUD

Kuna Keap1-Nrf2-ARE raja aktiveerimine on seotud ainult naha sensibiliseerimise kahjuliku toime raja teise olulise etapiga, on ebatõenäoline, et andmed, mis on saadud selle raja aktiveerimisel põhinevate katsemeetoditega, oleksid piisavad eraldi kasutamiseks, et teha järeldus kemikaali võime kohta nahka sensibiliseerida. Seepärast tuleks käesoleva meetodiga saadud andmeid käsitada ainult seoses selliste ühtsete lähenemisviisidega nagu IATA ja kombineerida neid täiendava teabega, näiteks sellisega, mis on saadud naha sensibiliseerimise kahjuliku toime raja teisi olulisi etappe käsitlevatest *in vitro* katsetest, ning kasutada peale katsemeetodite ka muid meetodeid, sealhulgas võrdlemist kemikaali analoogidega. Näited, kuidas ARE-Nrf2 lutsiferaasi katsemeetodit kombinatsioonis muu teabega kasutada, on avaldatud teaduskirjanduses (13, 16–19).

Käesolevat katsemeetodit kasutatakse selleks, et aidata eristada naha sensibilisaatoreid (st ÜRO GHSi / CLP-määruse 1. kategooria) nahka mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest ühtse lähenemisviisi kontekstis. Seda meetodit ei saa kasutada eraldivõetuna, sellega ei saa kategoriseerida naha sensibilisaatoreid ÜRO GHSis / CLP-määruses määratletud alamkategooriatesse 1A ja 1B ega prognoosida toime tugevust ohutushindamisega seotud otsuste tegemiseks. Sõltuvalt õigusraamistikust võib eraldivõetuna siiski kasutada positiivset tulemust kemikaali klassifitseerimiseks ÜRO GHSi / CLP-määruse 1. kategooriasse.

Valideerimisuuringu andmete ning katsemeetodi sõltumatuks vastastikuseks hindamiseks kasutatud *in-house* testimise alusel osutus KeratinoSens™ test tõendatult ülevõetavaks rakukultuurimeetodites kogenud laborite poolt. Prognooside korratavuse tase, mida võib selle katsemeetodi puhul eeldada, on ligikaudu 85 % nii laborisisese kui ka laboritevahelise korratavuse puhul (14). KeratinoSens™ testi täpsus (77 %, 155/201), tundlikkus (78 %, 71/91) ja spetsiifilisus (76 %, 84/110) naha sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi/CLP-määruse 1. kategooria) eristamisel nahka mitte sensibiliseerivatest ainetest, võrreldes LLNA tulemustega, arvutati kõigi andmete põhjal mis esitati EURL ECVAMile katsemeetodi hindamiseks ja vastastikuseks hindamiseks (14). Need arvulised väärtused on sarnased hiljuti avaldatud ligikaudu 145 aine *in-house* testimise tulemustega (täpsus 77 %, tundlikkus 79 %, spetsiifilisus 72 %) (13). KeratinoSens™ testiga on tõenäosem alaprognoosida väikese kuni mõõduka naha sensibiliseerimise potentsiaaliga kemikaale (st ÜRO GHSi / CLP-määruse alamkategooria 1B) kui kemikaale, millel on tugev nahka sensibiliseeriv toime (st ÜRO GHSi/CLP-määruse alamkategooria 1A) (13, 14). Kokkuvõttes nähtub sellest teabest, et KeratinoSens™ test on kasulik meetod, mis aitab kindlaks teha naha sensibiliseerimise ohtu.

▼M7

Ainsa katsemeetodina kasutatava KeratinoSens™ testi täpsuse väärtused on siinkohal siiski vaid näitlikud, sest katsemeetodit tuleb kohaldada ühtse lähenemisviisi kontekstis kombinatsioonis muudest allikatest pärit teabega ja kooskõlas eespool punktis 9 esitatud nõuetega. Kui hinnatakse naha sensibiliseerimise katsemeetodeid, milles ei kasutata katseloomi, tuleb lisaks arvestada sellega, et LLNA nagu ka muud loomkatsed ei pruugi täielikult peegeldada kemikaali tegelikku toimet huvipakkuvas liigi, s.o inimese puhul.

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse terminit „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava terminina ja see ei ole seotud ARE-Nrf2 lutsiferaasi katsemeetodi kohaldatavusega ainete ja/või segude uurimiseks. Praegu olemasolevast teabest nähtub, et KeratinoSens™ test on kohaldatav paljude uuritavate kemikaalide puhul, millel on erinevad orgaanilised funktsionaalrühmad, toimemehhanismid, erinev nahka sensibiliseeriva toime tugevus (*in vivo* katsetes määratuna) ja erinevad füüsikalis-keemilised omadused (9, 12–14). Põhiliselt uuriti ühe koostisosaga aineid, kuigi piiratud kogus andmeid on olemas ka katsetest segudega (20). See katsemeetod on siiski tehniliselt kohaldatav mitme koostisosaga ainete ja segude uurimiseks. Enne kui kasutada seda meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb siiski kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist. Peale selle, kui uuritakse mitme koostisosaga aineid või segusid, tuleb võtta arvesse tsütotoksiliste koostisosade võimalikku segavat mõju vaadeldavatele toimetele. See katsemeetod on kohaldatav lahustuvatele uuritavatele kemikaalidele või kemikaalidele, mis moodustavad kas vees või DMSOs stabiilse dispersiooni (st kolloidi või suspensiooni, milles uuritav kemikaal ei sadestu ega eraldu lahustist eri faasideks; kui uuritakse mitme koostisosaga ainet või segu, kehtib see tingimus uuritava kemikaali kõikide koostisosade kohta). Uuritavaid kemikaale, mis ei vasta neile tingimustele suurimas nõutavas lõppkontsentratsioonis 2 000 μM (vt punkt 22), võib siiski testida väiksemates kontsentratsioonides. Sellisel juhul võib positiivsuse kriteeriumidele vastavaid tulemusi, mis on kirjeldatud punktis 39, siiski kasutada selleks, et toetada kemikaali määramist naha sensibilisaatoriks, samas kui negatiivset tulemust, mis on saadud kontsentratsioonidega < 1 000 μM, tuleb käsitada ebaselgena (vt prognoosimudel punkt 39). Üldiselt on aineid, mille log P-väärtus on kuni 5, edukalt uuritud, samas kui äärmiselt hüdrofoobsed ained, mille log P on üle 7, jäävad välja katsemeetodi teadaolevast kohaldamisalast (14). Ainete kohta, mille log P on 5–7, on olemas vaid piiratud teavet.

Negatiivseid tulemusi tuleb tõlgendada ettevaatusega, sest ained, mis reageerivad vaid lüsiinijääkidega, võidakse selle katsemeetodiga määrata negatiivseks. Peale selle võivad prohapteenid (st kemikaalid, mis vajavad ensümaatilist aktiveerimist, nt P450 ensüümide abil) ja prehapteenid (st kemikaalid, mis aktiveeruvad autooksüdeerumisel), eriti need, mis on aeglase oksüdeerumiskiirusega, anda negatiivseid tulemusi kasutatava rakuliini (21) piiratud metaboliseeriva võime ja katsetingimuste tõttu. Teisalt võivad uuritavad kemikaalid, mis ei toimi sensibilisaatorina, kuid on siiski keemilised mõjurid, põhjustada valepositiivseid tulemusi (14). Peale selle ei saa alati usaldusväärselt hinnata uuritavaid kemikaale, mis on väga tsütotoksilised. Lõpuks võivad uuritavad kemikaalid, mis toimivad lutsiferaasile, moonutada lutsiferaasi aktiivsust rakupõhistes katsetes, mis põhjustab kas näilist inhibitsiooni või suurenenud luminestsentsi (22). Näiteks on teatatud, et fütoöstrogeenid suuremas kontsentratsioonis kui 1 μM segavad lutsiferaasi signaale teistes lutsiferaasipõhistes reportergeeni katsetes, sest esineb

▼M7

lutsiferaasi reportergeeni üleaktiveerimine. Seetõttu tuleb hoolikalt uurida lutsiferaasi ekspressiooni, mis on saadud suurtes kontsentratsioonides fütoöstrogeenide või sarnaste kemikaalidega, mille suhtes kahtlustatakse, et neil on fütoöstrogeenilaadne lutsiferaasi reportergeeni üleaktiveeriv toime (23). Kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa kasutada muude konkreetsete kemikaalirühmade puhul, ei tohi seda nende konkreetsete kemikaalirühmade puhul kasutada.

Lisaks naha sensibilisaatorite eristamisele nahka mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest, saab KeratinoSens™ testiga teavet ka kontsentratsiooni-toime seose kohta, mis võib aidata hinnata kemikaali sensibiliseerimise potentsiaali, kui kasutada seda selliste ühtsete lähenemisviiside puhul nagu IATA (19). Vaja on täiendavaid uuringuid, mis eelistatult põhinevad usaldusväärsetel inimpõhistel andmetel, et teha kindlaks, kuidas saab KeratinoSens™ testi tulemusi kasutada toime tugevuse hindamiseks (24) ning sensibilisaatorite jagamiseks alamkategooriatesse vastavalt ÜRO GHSile/CLP-määrusele.

KATSE PÕHIMÕTE

ARE-Nrf2 lutsiferaasi katsemeetodis kasutatakse kasvunõu pinnale kinnituvat immortaliseeritud rakuliini, mis on saadud selektiivse plasmiidiga stabiilselt transfekteeritud inimese keratinotsüütidest HaCaT. Selles rakuliinis reguleerib lutsiferaasi geeni transkriptsiooni konstitutiivne promootor, mis on liitunud ARE-elemendiga geenist, mida teadaolevalt aktiveerivad kontaktsensibilisaatorid (25, 26). Lutsiferaasi signaal kajastab endogeensest transkriptsioonifaktorist Nrf2 sõltuvate geenide aktiveerimist sensibilisaatorite poolt ning on tõendatud, et rekombinantse rakuliini lutsiferaasi signaal sõltub transkriptsioonifaktorist Nrf2 (27). See võimaldab pärast rakkude kokkupuudet elektrofiilsete substraatidega kvantitatiivselt mõõta lutsiferaasi geeni induktsiooni Nrf2-transkriptsioonifaktori aktiivsuse näitajana (luminestsentsi määramise kaudu), kasutades üldkasutatavaid valgust tekitavaid lutsiferaasi substraate.

KeratinoSens™ testis käsitatakse uuritavad kemikaale positiivsena, kui nad põhjustavad lutsiferaasi aktiivsuse induktsiooni statistiliselt olulise ja läviväärtust ületava suurenemise (st üle 1,5kordse või üle 50 % suurenemise) kontsentratsioonis, mis on väiksem kui kindlaks tehtud kontsentratsioon, mis ei mõjuta oluliselt rakkude eluvõimelisust (st alla 1 000 μM ja kontsentratsioonis, mille korral rakkude eluvõimelisus on üle 70 % (9, 12)). Selleks määratakse maksimaalne lutsiferaasi aktiivsuse induktsioon (I_{max}) kordades, võrreldes lahusti (negatiivse) kontrolliga. Kuna uuritavat kemikaali lisatakse rakkudele eri kontsentratsioonide sarjana, tuleb annuse-toime kõvera alusel peale selle interpoleerida kontsentratsioon, mida on vaja, et tekitada lutsiferaasi aktiivsuse induktsiooni statistiliselt oluline läviväärtust ületav suurenemine (st $EC_{1,5}$ väärtus) (arvutamiseks vt punkt 32). Lisaks tuleb teha paralleelsed tsütotoksilisuse mõõtmised, et hinnata, kas lutsiferaasi aktiivsuse induktsioon tekib subtsütotoksilistel kontsentratsioonidel.

Enne käesoleval katsemeetodil põhineva ARE-Nrf2 lutsiferaasi testi rutiinset kasutamist tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, kasutades 2. liites esitatud pädevuse kontrolli aineid.

Uute või muudetud *in vitro* ARE-Nrf2 lutsiferaasi katsemeetodite valideerimise lihtsustamiseks on olemas toimivusnõuded, mis on sarnased KeratinoSens™ testiga ning võimaldavad nende lisamisega selle katsemeetodi õigeaegset muutmist (28). Vastastikune andmete tunnustamine vastavalt OECD kokkuleppele tagatakse vaid nende katsemeetodite puhul, mis on valideeritud kooskõlas toimivusnõuetega, kui need katsemeetodid on läbi vaadatud ja lisatud OECD poolt vastavasse juhendisse.

▼M7

KATSE KÄIK

Praegu on ainus selle katsemeetodiga hõlmatud teaduslikult põhjendatud katsesüsteem KeratinoSens™ test (9, 12–14). KeratinoSens™ testi standardne töökord on kättesaadav ja seda tuleb järgida testi juurutamisel ja kasutamisel laboris (15). Labor, kes soovib seda katsemeetodit rakendada, võib saada KeratinoSens™ testis kasutatud rekombinantse rakuliini, sõlmides litsentsilepingu selle katsemeetodi väljatöötajaga. Järgmistes punktides esitatakse ARE-Nrf2 lutsiferaasi katsemeetodi põhikomponendid ja katse käik.

Keratinotsüütide kultuuri valmistamine

Kasutada tuleb transgeenset rakuliini, mille genoomis on stabiilne lutsiferaasi geeni insertsioon, mida reguleerib ARE-element (nt KeratinoSens™ rakuliin). Pärast rakkude saamist kasvatatakse neid (nt 2–4 passaaži) ja säilitatakse külmutatult homogeense lähterakuvaruna. Sellest lähtevarust võetud rakke võib ümber külvata kuni passaaži maksimumarvuni (mis on KeratinoSens™ rakkude puhul 25) ja teha tavapäraselt katseid, kasutades asjakohast kultiveerimissöödet (KeratinoSens™ rakkude puhul DMEM, millele on lisatud seerum ja Geneticin).

Katse tegemiseks peavad rakud olema saavutanud konfluentsuse 80–90 % ning tuleb tagada, et rakud ei saavutaks kunagi täielikku konfluentsust. Üks päev enne katse tegemist tuleb rakud koguda ja kanda 96-kannulisse mikrotiiterplaati (KeratinoSens™ testi puhul 10 000 rakku kannu kohta). Rakusademe teket külvi ajal tuleb hoolikalt vältida, et tagada rakkude ühetaoline arvuline jaotumine kannude vahel. Kui seda ei tehta, võib tulemuseks olla kannudevaheline suur varieeruvus. Iga korduse jaoks kasutatakse lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks kolme paralleelproovi ja ühte paralleelproovi kasutatakse rakkude eluvõimelisuse hindamiseks.

Uuritava kemikaali ja kontrolli ainete preparaatide valmistamine

Uuritava kemikaali ja kontrolli ainete preparaadid valmistatakse katse tegemise päeval. KeratinoSens™ testi puhul lahustatakse uuritavad kemikaalid dimetüülsulfoksiidis (DMSO) soovitava lõppkontsentratsioonini (nt 200 mM). DMSO lahuseid käsitatakse isesteriliseeruvana, seepärast ei ole steriilset filtrimist vaja. Uuritav kemikaal, mis ei lahustu DMSOs, lahustatakse steriilses vees või rakusöötmes ning lahused steriliseeritakse, nt filtrimisega. Määramata molekulmassiga uuritava kemikaali puhul tehakse KeratinoSens™ testi korral põhilahus vaikimisi valitud kontsentratsioonil (40 mg/ml või 4 % (mass/ruumala)). Muude lahustite kui DMSO puhul kasutatakse vett või rakusöödet ning selle kohta tuleb esitada piisav teaduslik põhjendus.

DMSOs lahustatud uuritava kemikaali põhilahusest tehakse DMSOga lahjenduste sari, et saada katse jaoks kemikaali 12 põhikontsentratsiooni (0,098 kuni 200 mM KeratinoSens™ testis). DMSOs mittelahustuva uuritava kemikaali lahjendused põhikontsentratsioonide saamiseks tehakse steriilse vee või steriilse rakusöötmega. Sõltumata kasutatud lahustist lahjendatakse põhikontsentratsioone täiendavalt 25 korda seerumit sisaldavasse rakusöötmesse ja kasutatakse lõpuks töötluseks täiendava neljakordse lahjendusteguriga, nii et uuritava kemikaali lõppkontsentratsioonid on KeratinoSens™ testi puhul vahemikus 0,98–2 000 μM. Muid kontsentratsioone võib põhjendatult kasutada (nt tsütotoksilisuse või halva lahustuvuse tõttu).

KeratinoSens™ testis kasutatav negatiivne (lahusti) kontroll on DMSO (CASi nr 67-68-5,≥ puhtus 99 %), milleks valmistatakse ette kuus kannu plaadi kohta. See lahjendatakse samamoodi nagu põhikontsentratsioonid punktis 22, nii et negatiivse kontrolli (lahusti) lõppkontsentratsioon on 1 %, mis teadaolevalt ei

▼M7

mõjuta rakkude eluvõimelisust ja vastab sellele samale DMSO kontsentratsioonile, mida on kasutatud uuritava kemikaali ja positiivse kontrolli proovides. DMSOs mitte lahustuva uuritava kemikaali korral, mille lahjendused tehti vees, peab DMSO sisaldus lõpplahuses kõigis kannudes olema kohandatud 1 %-ni, nagu muude uuritavate kemikaalide ja kontrollainete puhul.

KeratinoSens™ testi puhul kasutatav positiivne kontroll on kaneelaldehüüd (CASi nr 14371-10-9, puhtus ≥ 98 %), millest on tehtud viie põhikontsentratsiooniga lahjenduste sari DMSOs, vahemikus 0,4–6,4 mM (6,4 mM põhilahusest), ja mis on lahjendatud katse põhikontsentratsioonideks, nagu on kirjeldatud punktis 22, nii et positiivse kontrolli lõppkontsentratsioonid on vahemikus 4–64 μM. Muid sobivaid positiivseid kontrolle, millega on eelistatavalt võimalik saavutada kontsentratsiooni $EC_{1,5}$ keskvahemiku väärtusi, võib kasutada, kui on olemas varasematest katsetest saadud andmed, mille alusel saab tuletada katseseeria nõuetekohasuse kriteeriumid.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete kasutamine

Iga uuritava kemikaali ja positiivse kontrolli aine kohta on vaja (positiivsuse või negatiivsuse) prognoosimiseks teha üks katse, mis koosneks vähemalt kahest sõltumatust korduskatsest, milles mõlemas oleks vähemalt kolm paralleelproovi (st n = 6). Kui sõltumatute korduskatsete vahel saadakse lahknevad tulemused, tuleb teha kolmas korduskatse, milles on kolm paralleelproovi (st n = 9). Iga sõltumatu korduskatse tehakse eri päeval, kasutades uuritava kemikaali värskeid põhilahuseid ning sõltumatult kogutud rakke. Rakud võivad olla siiski samast passaažist.

Pärast punktis 20 kirjeldatud külvi kasvatatakse rakke 24 tundi 96-kannulistel mikrotiiterplaatidel. Sööde eemaldatakse ja asendatakse värske söötmega (KeratinoSens™ testi puhul 150 μl seerumiga söödet, milles ei ole antibiootikumi Geneticin), millele lisatakse 50 μl 25kordse lahjendusega uuritava kemikaali või kontrollainete lahust. Taustaväärtuste hindamiseks tuleb vähemalt üks kann mikrotiiterplaadi kohta jätta tühjaks (selles ei ole rakke ja seda ei töödelda kuidagi).

Mikrotiiterplaate inkubeeritakse ligikaudu 48 tundi temperatuuril 37 ± 1 °C 5 % CO_2 keskkonnas KeratinoSens™ testi puhul. Tuleb jälgida, et lenduvad uuritavad kemikaalid ei aurustuks ning vältida kannudevahelist uuritava kemikaaliga ristsaastumist, kattes näiteks enne uuritava kemikaaliga inkubeerimist plaadid fooliumiga.

Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine

Asjakohaste luminestsentsi näitude tagamiseks on kriitilise tähtsusega kolm tegurit:

— tundliku luminomeetri valimine,

— valgusega ristsaastumise vältimiseks piisavalt sügavate kannudega mikrotiiterplaatide kasutamine ja

— piisava tundlikkuse ja väikese varieeruvuse tagamiseks piisavalt tugeva valgussignaaliga lutsiferaasi substraadi kasutamine.

Enne katse tegemist tuleb teha 3. liites kirjeldatud kontrollkatse, et tagada nende kolme nõude täitmine.

Pärast 48 tundi uuritava kemikaali ja kontrollainetega inkubeerimist KeratinoSens™ testis pestakse rakud fosfaatpuhvrit sisaldava keedusoolalahusega ja igasse kannu lisatakse 20 minutiks toatemperatuuril luminestsentsi määramiseks asjakohast rakkude lüüsimise puhvrit.

▼M7

Mikrotiiterplaadid rakulüsaadiga asetatakse seejärel näitude lugemiseks luminomeetrisse, mis KeratinoSens™ testi jaoks on järgmise seadistusega: i) igasse kannu lutsiferaasi substraadi (st 50 µl) lisamine, ii) 1 sekund inkubeerimist ja iii) 2 sekundit lutsiferaasi aktiivsuse integreerimine. Juhul kui kasutatakse muid seadeid, näiteks kasutatava luminomeetri mudelist sõltuvaid, tuleb neid põhjendada. Peale selle võib kasutada ka helendavat substraati, eeldusel et 3. liites esitatud kontrollkatse on õnnestunud.

Tsütotoksilisuse hindamine

Rakkude eluvõimelisuse määramiseks KeratinoSens™ testis vahetatakse sööde pärast 48 tundi kestnud kokkupuuteaega värske söötmega, milles on ka MTT ([3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinise tetrasooliumbromiid; CASi nr 298-93-1) ja rakke inkubeeritakse 4 tundi temperatuuril 37° C 5 % CO_2 keskkonnas. Seejärel eemaldatakse MTTd sisaldav sööde ning rakud lüüsitakse üleöö (nt lisatakse igasse kannu 10 % naatriumdodetsüülsulfaati (SDS)). Pärast loksutamist mõõdetakse fotomeetriga neelduvust lainepikkusel 600 nm.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete hindamine

KeratinoSens™ testis arvutatakse järgmised näitajad:

— uuritud kemikaali ja positiivse kontrolli lutsiferaasi aktiivsuse maksimaalse induktsiooni keskmine väärtus kordades (I_{max});

— kontsentratsiooni $EC_{1,5}$ väärtus, mis on kontsentratsioon, mille korral lutsiferaasi aktiivsuse saadud induktsioon on suurem kui läviväärtus 1,5 korda (st lutsiferaasi aktiivsus on suurenenud 50 %); ja

— kontsentratsioonide IC_{50} ja IC_{30} väärtused, mille korral rakkude eluvõimelisus on vähenenud vastavalt 50 % ja 30 %.

— Lutsiferaasi aktiivsuse induktsiooni arv kordades arvutatakse valemi 1 alusel ja üldine maksimaalne induktsiooni arv kordades ((I_{max}) arvutatakse kõigi korduste keskmisena.

Valem 1:

$$Induktsiooni\ arv\ kordades = \frac{(L_{proov} - L_{tühikatse})}{(L_{lahusti} - L_{tühikatse})}$$

kus:

L_{proov} on uuritava kemikaaliga kannu luminestsentsi näit

$L_{tühikatse}$ on tühja, ilma rakkude ja töötlemisaineteta, kannu luminestsentsi näit

$L_{lahusti}$ on rakke ja lahusti (negatiivset) kontrolli sisaldavate kannude keskmine luminestsentsi näit

$EC_{1,5}$ arvutatakse lineaarse interpoleerimise abil võrrandi 2 järgi ja üldine $EC_{1,5}$ arvutatakse üksikkorduste geomeetrilise keskmisena.

Valem 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

kus:

C_a on vähim kontsentratsioon µM-des, mille korral induktsioon on suurem kui 1,5 korda

C_b on suurim kontsentratsioon µM-des, mille korral induktsioon on väiksem kui 1,5 korda

I_a induktsiooni suurenemine kordades, mis on mõõdetud vähimal kontsentratsioonil, millel induktsioon on suurem kui 1,5 korda (paralleelproovi kolme kannu keskmine)

I_b induktsiooni suurenemine kordades, mis on mõõdetud suurimal kontsentratsioonil, millel induktsioon on väiksem kui 1,5 korda (paralleelproovi kolme kannu keskmine)

Rakkude eluvõimelisus arvutatakse võrrandi 3 järgi.

Valem 3:

$$Viability = \frac{(V_{proov} - V_{tühikatse})}{V_{lahusti} - V_{tühikatse}} \times 100$$

kus:

V_{proov} on uuritava kemikaaliga kannu MTT-absorptsiooni näit

$V_{tühikatse}$ on tühja, ilma rakkude ja töötlemisaineteta, kannu MTT-absorptsiooni näit

$V_{lahusti}$ on rakke ja lahusti (negatiivset) kontrolli sisaldavate kannude keskmine MTT-absorptsiooni näit

IC_{50} ja IC_{30} arvutatakse lineaarse interpoleerimise abil võrrandi 4 järgi ning üldine IC_{50} ja üldine IC_{30} arvutatakse üksikkorduste geomeetriliste keskmistena.

Valem 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha} \right) + C_\alpha$$

kus:

X on rakkude eluvõimelisuse vähenemise % arvutataval kontsentratsioonil (50 ja 30 vastavalt IC_{50} ja IC_{30} korral)

C_a on vähim kontsentratsioon µM-des, mille korral rakkude eluvõimelisuse vähenemine on > x %

C_b on suurim kontsentratsioon µM-des, mille korral rakkude eluvõimelisuse vähenemine on < x %

V_a on rakkude eluvõimelisuse % vähimal kontsentratsioonil, mille korral eluvõimelisuse vähenemine on > x %

V_b on rakkude eluvõimelisuse % suurimal kontsentratsioonil, mille korral rakkude eluvõimelisuse vähenemine on < x %

Iga kontsentratsiooni kohta, mille korral esineb > 1,5kordne lutsiferaasi aktiivsuse induktsioon, arvutatakse statistiline olulisus (nt kahesuunalise Studenti t-testiga), võrreldes kolme paralleelproovi luminestsentsi väärtusi lahusti (negatiivse) kontrolliga kannudes, et määrata, kas lutsiferaasi aktiivsuse induktsioon on statistiliselt oluline ($p < 0.05$). Vähim kontsentratsioon, millel lutsiferaasi aktiivsuse induktsioon on suurem kui 1,5 korda, on väärtus, mis määrab $EC_{1,5}$ väärtuse. Igal juhul kontrollitakse, kas see väärtus on väiksem IC_{30} väärtusest, millest nähtub, et $EC_{1,5}$ määraval kontsentratsioonil on rakkude eluvõimelisuse vähenemine väiksem kui 30 %.

▼M7

Andmeid soovitatakse kontrollida graafikute abil. Kui selget annuse-toime kõverat ei täheldata või kui saadakse kahefaasiline annuse-toime kõver (st ületab läviväärtust 1,5 kahes kohas), tuleb katset korrata, et kontrollida, kas see on uuritavale kemikaalile iseloomulik või on seotud katse veaga. Kui kahefaasiline reaktsioon on sõltumatus katses korratav, tuleb esitada $EC_{1,5}$ väiksem väärtus (esimene kontsentratsioon, millel läviväärtus 1,5 ületatakse).

Harvadel juhtudel, kui täheldatakse statistiliselt ebaolulist rohkem kui 1,5kordset induktsiooni, millele järgneb statistiliselt oluline induktsioon suuremal kontsentratsioonil, tuleb selle korduskatse tulemusi käsitada kehtiva ja positiivsena vaid juhul, kui 1,5kordset läviväärtust ületav induktsioon saadi mittetsütotoksilise kontsentratsiooniga.

Uuritavate kemikaalide puhul, mis põhjustavad 1,5kordse või suurema induktsiooni juba kõige väiksemal kontsentratsioonil 0,98 μM, määratakse $EC_{1,5}$ väärtus < 0,98 annuse-toime kõvera visuaalse kontrollimise alusel.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

KeratinoSens™ testi kasutamisel tuleb täita järgmised katse nõuetekohasuse kriteeriumid. Esiteks peab positiivne kontroll, kaneelaldehüüd, vähemalt ühes katsekontsentratsioonis (4–64 μM) põhjustama statistiliselt olulise (nt t-testi põhjal) läviväärtust 1,5 ületava lutsiferaasi aktiivsuse induktsiooni.

Teiseks peab $EC_{1,5}$ väärtus olema katset tegeva labori varasemate katsete keskväärtuse suhtes vahemikus, mis jääb kahe standardhälbe piiridesse (nt valideerimise andmete põhjal 7–30 μM) ning seda vahemikku tuleb korrapäraselt ajakohastada. Lisaks peab kaneelaldehüüdi kontsentratsiooni 64 μM kolme paralleelproovi keskmine induktsioon jääma vahemikku 2–8. Kui viimane kriteerium ei ole täidetud, tuleb hoolikalt kontrollida kaneelaldehüüdi annuse-toime seost ning katse tulemused võib aktsepteerida ainult juhul, kui on olemas selge annuse-toime seos, mille alusel lutsiferaasi aktiivsuse induktsioon suureneb positiivse kontrolli kontsentratsiooni suurenedes.

Negatiivse kontrolli (lahusti) DMSO luminestsentsi näidu variatsioonikordaja peab olema alla 20 % igas korduses, mis koosneb 6 kannust testituna kolme paralleelproovina. Kui varieeruvus on suurem, tuleb tulemused lugeda kehtetuks.

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimudel

KeratinoSens™ testi prognoosi käsitatakse positiivsena, kui kahel juhul kahest või sama korduse puhul kahel juhul kolmest on täidetud kõik järgmised neli tingimust, muidu loetakse KeratinoSens™ testi põhine prognoos negatiivseks (joonis 1):

1. I_{max} on suurem kui (>) 1,5 korda ning erineb statistiliselt oluliselt (määratuna kahesuunalise Studenti t-testiga) lahusti (negatiivsest) kontrollist;

2. rakkude eluvõimelisus on suurem kui (>) 70 % kõige väiksemal kontsentratsioonil, millel lutsiferaasi aktiivsuse induktsioon on suurem kui 1,5 korda (st kontsentratsioonil, mis määrab $EC_{1,5}$);

3. $EC_{1,5}$ väärtus on väiksem kui (<) 1 000 μM (või < 200 μg/ml uuritavate kemikaalide puhul, millel puudub kindlaks määratud molekulmass);

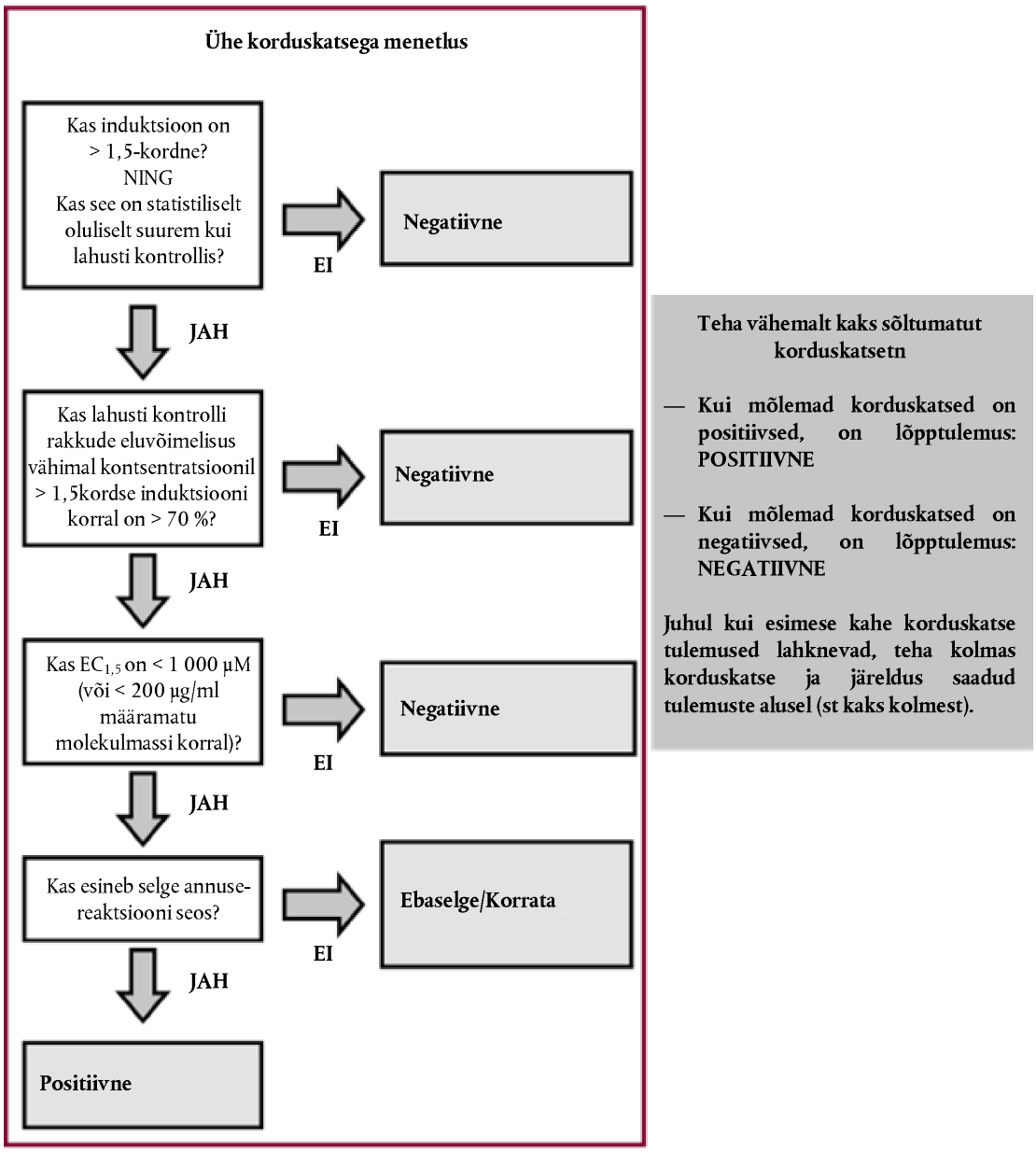
4. jälgitav on lutsiferaasi induktsiooni üldine annuse-toime sõltuvus (või bifaasiline toime, nagu on selgitatud punktis 33).

▼M7

Kui konkreetses korduses on täidetud kolm esimest tingimust, kuid lutsiferaasi induktsiooni selget annuse-toime sõltuvust ei ole võimalik sedastada, tuleb selle korduse tulemused lugeda ebaselgeks ning võib vaja minna täiendavaid katseid (joonis 1). Lisaks tuleb ebaselgena käsitada negatiivset tulemust kontsentratsioonidel < 1 000 µM (või <200 µg/ml uuritavate kemikaalide puhul, millel puudub kindlaks määratud molekulmass) (vt punkt 11).

Joonis 1

KeratinoSens™ testi prognoosimudel. KeratinoSens™ testi prognoosi tuleb arvesse võtta ühtse lähenemisviisi raamistikus ning kooskõlas punkti 9 ja 11 nõuetega



Harvadel juhtudel võib uuritav kemikaal, mis tsütotoksilisele tasemele lähedasel kontsentratsioonil indutseerib lutsiferaasi aktiivsust, olla positiivne mõnes mittetsütotoksilise tasemega korduskatses (st $EC_{1,5}$ määrav kontsentratsioon on väiksem kui (<) IC_{30}) ning on muudes korduskatsetes positiivne ainult tsütotoksilisel tasemel (st $EC_{1,5}$ määrav kontsentratsioon on suurem kui (>) IC_{30}). Sellise

▼M7

uuritava kemikaaliga tuleb teha uus katseseeria kitsama annuse-toime analüüsiga, kasutades väiksemat lahjendustegurit (nt 1,33 või Ö2 (= 1,41) kordset kannudevahelist lahjendust), et teha kindlaks, kas induktsioon esines tsütotoksilisel tasemel või mitte (9).

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal

— Ühe koostisosaga aine

  — Kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;

  — füüsiline välimus, lahustuvus vees, lahustuvus DMSOs, molekulmass ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;

  — puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

  — uuritava kemikaali töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

  — uuritud kontsentratsioon(id);

  — säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;

— Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, komplekssed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:

  — kirjeldatakse nii palju kui võimalik, lähtudes koostisosade keemilistest identifitseerimisandmetest (vt eespool), puhtusest, kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;

  — füüsiline välimus, lahustuvus vees, lahustuvus DMSOs ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;

  — molekulmass või näiline molekulmass teadaoleva koostisega segude/polümeeride korral või muu uuringu tegemiseks asjakohane teave;

  — uuritava kemikaali töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

  — uuritud kontsentratsioon(id);

  — säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;

Kontrollid

— Positiivne kontroll

  — Kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;

  — füüsiline välimus, lahustuvus vees, molekulmass ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses ja kui see on asjakohane;

  — puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

  — kontrollkemikaali töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

  — uuritud kontsentratsioon(id);

  — säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;

▼M7

— viide varasematele positiivse kontrolli tulemustele, mis tõendavad sobivaid analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriume, kui asjakohane.

— Negatiivne (vehiikuli) kontroll

— kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid ja/või muud identifikaatorid;

— puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

— füüsiline välimus, molekulmass ja muud füüsikalis-keemilised omadused, nii palju kui võimalik, juhul, kui kasutatakse muid negatiivseid kontrolle / vehiikuleid kui need, mida on käesolevas katsemeetodis nimetatud, kättesaadavas ulatuses;

— säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti valimise põhjendus.

Katsemeetodi tingimused

— sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

— kasutatud katsemeetodi kirjeldus;

— kasutatud rakuliin, selle säilitamistingimused ning allikas (nt asutus, kellelt rakud saadi);

— katsetes kasutatud rakkude passaažide arv ning konfluentsuse tase;

— enne testimist rakkude külvamiseks kasutatud rakuloendusmeetod ning võetud meetmed, millega tagati rakkude arvu homogeenne jaotus (vt punkt 20);

— kasutatud luminomeeter (nt mudel), sealhulgas seadme seadistused, kasutatud lutsiferaasi substraat ja asjakohaste luminestsentsi mõõtmiste tõendus, mis põhineb 3. liites kirjeldatud kontrollkatsel;

— labori kasutatud meetod, millega tõendatakse katsemeetodi tegemise pädevust (nt pädevuse kontrolli ainetega katsetamine) või meetod, millega tõendatakse katsemeetodi korratavat toimivust ajas.

Katse käik

— Kordus- ja paralleelproovide arv;

— uuritava kemikaali kontsentratsioonid, kasutamise kord ning kasutatud kokkupuuteaeg (kui erineb soovitatust);

— kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;

— kasutatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kirjeldus;

— kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus.

Tulemused

— Iga korduskatse kohta esitatakse tabelina uuritava kemikaali ja positiivse kontrolli korral saadud I_{max}, $EC_{1,5}$ ja rakkude eluvõimelisuse tulemused (st IC_{50}, IC_{30}), nagu ka keskväärtused (I_{max}: keskmine; $EC_{1,5}$ ja rakkude eluvõimelisuse väärtused: geomeetriline keskmine) ning SD, mis on arvutatud kõigi konkreetsete korduskatsete andmetest, ja prognoosimudelil põhinev uuritava kemikaali kohta antud hinnangu põhjendus;

▼M7

— iga katse negatiivse kontrolli luminestsentsi näitudega saadud variatsioonikordaja;

— graafik, millel on lutsiferaasi aktiivsuse induktsiooni ja rakkude eluvõimelisuse annuse-toime seose kõverad;

— mis tahes muude asjakohaste vaatlusandmete kirjeldus, kui kohaldatav.

Tulemuste arutelu

— KeratinoSens™ testiga saadud tulemuste arutelu;

— katsemeetodiga saadud tulemuste arvesse võtmine ühtse lähenemisviisi kontekstis, kui muu asjakohane teave on kättesaadav.

Järeldus

KIRJANDUS

(1) United Nations (UN) (2013), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Kättesaadav aadressil: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012), „The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence“, *OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 168*, OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011), „Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010“, *Archives of Toxicology* 85, 367–485.

(4) Käesoleva lisa peatükk B.42, „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse“.

(5) Käesoleva lisa peatükk B.6, „Naha sensibiliseerimine“.

(6) Käesoleva lisa peatükk B.50: „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse: DA“.

(7) Käesoleva lisa peatükk B.51, „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse: BrdU-ELISA“.

(8) Natsch A. (2010), „The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers“, *Toxicological Sciences* 113, 284–292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010), „Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*“, *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281–290.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005), „The role of Keap1 in cellular protective responses“, *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 1779–1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013), „The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer“, *Redox Biol.* 1(1), 45–49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011), „The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories“. *Toxicol. in Vitro* 25, 733–744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013), „A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation“, *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337–1352.

(14) EC EURL-ECVAM (2014), „Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing“, 42 pp. Kättesaadav aadressil: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013), „Protocol 155: KeratinoSens™.“, 17 pp. Kättesaadav aadressil: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/-methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009), „Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing“, *Toxicol. Sci.* 107, 106–121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011), „Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach“, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389–400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012), „Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential“, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489–504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013), „Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice“, *J Appl Toxicol.* 33, 1353–1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013), „The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study“, *Toxicology in Vitro* 27, 1220–1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013), „Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*“, *Arch. Toxicol.* 87, 1683–1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010), „Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology“, *Chemistry and Biology* 17, 646–657.

(23) OECD (2012), „BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists“, *OECD Guidelines for Chemical Testing* No. 457, OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003), „Contact sensitization: Classification according to potency“, European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006), „Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing“, *J. Invest. Assoc.*, 126, 1813–1822.

▼**M7**

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004), „Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen“, *Toxicol. Lett.* 150, 301–316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013), „Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events“, *Toxicol. in Vitro* 27, 2225–2232.

(28) OECD (2015), „Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods“, *OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment* No.213, OECD, Paris.

(29) OECD (2005), „Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, *OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* No.23, OECD, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

1. liide

MÕISTED

Aine – keemilised elemendid ja nende ühendid, kas looduslikud või tootmisprotsessiga saadud, välja arvatud lahusti, mida on võimalik eraldada aine stabiilsust mõjutamata ja selle koostist muutmata (1).

ARE – ehk antioksüdatiivse reaktsiooni element (kasutatakse ka lühendit EpRE (*electrophile response element*, elektrofiilse reaktsiooni element) on reaktsiooni-element, mis esineb mitme tsütoprotektiivse ja II faasi geeni promootori ülesvoolujärjestuse piirkonnas. Kui seda aktiveerib Nrf2, vahendab ARE nende geenide transkriptsiooni signaali.

Asjakohasus – huvipakkuva toime ja katse vahelise seose kirjeldus, millest nähtub, kas see seos on tähenduslik ning kasulik konkreetse eesmärgi puhul. See on ulatus, mille piires saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasusega seoses võetakse arvesse ka katsemeetodi täpsust (kordustäpsust) (29).

$EC_{1,5}$ – interpoleeritud kontsentratsioon, millele vastab 1,5kordne lutsiferaasi induktsioon.

IC_{30} – kontsentratsioon, mis põhjustab rakkude eluvõimelisuse 30 % vähenemise.

IC_{50} – kontsentratsioon, mis põhjustab rakkude eluvõimelisuse 50 % vähenemise.

I_{max} – lutsiferaasi aktiivsuse maksimaalne induktsioonitegur, võrreldes lahusti (negatiivse) kontrolliga ja mõõdetuna ükskõik millisel uuritava kemikaali kontsentratsioonil.

Kahjuliku toime rada (*Adverse Outcome Pathway*, AOP) – sündmuste ahel alates sihtkemikaali või sarnaste kemikaalide rühma keemilisest struktuurist molekulaarse initsieerimisetapi kaudu vaadeldava toime kliinilise avaldumiseni *in vivo* (2).

Katsete tegemist ja hindamist käsitlev ühtne lähenemisviis (*Integrated Approach to Testing and Assessment*, IATA; lühendatult „ühtne lähenemisviis“) – struktureeritud lähenemisviis, mida kasutatakse kemikaali või kemikaalide rühma ohutegurite tuvastamiseks (võimalikkus), selle kirjeldamiseks (toime tugevus) ja/või ohutuse hindamiseks (võimalikkus / toime tugevus ja kokkupuude) ja millega ühendatakse strateegiliselt ning analüüsitakse kõik asjakohased andmed, et oleks olemas vajalik teave regulatiivse meetme võtmiseks seoses võimaliku ohu ja/või riskiga ja/või täiendavaks sihipäraseks (ja seega minimaalseks) katsetamiseks.

Keap1 – Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) on sensorvalk, mis reguleerib Nrf2 aktiivsust. Induktsiooni puudumisel on sensorvalgu Keap1 sihtmärk transkriptsioonifaktor Nrf2; sensorvalk põhjustab selle ubikvitinüleerimise ja proteolüütilise lõhustamise proteasoomis. Kui väiksed molekulid seovad end kovalentselt sensorvalgu Keap1 reaktsioonivõimeliste tsüsteiinijääkidega, võib see põhjustada Nrf2 dissotsieerumist sensorvalgust Keap1 (8) (10) (11).

Kemikaal – aine või segu.

Korratavus – sama kemikaali sama metoodikaga uurimisel saadud tulemuste kokkulangevus (vt usaldusväärsus) (29).

Lahusti/vehiikuli kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente peale uuritava kemikaali ning millele on lisatud kasutatav lahusti. Seda kasutatakse, et määrata lähtetaseme reaktsioon samas lahustis lahustatud uuritava kemikaaliga töödeldud proovides.

▼M7

Mitme koostisosaga aine – aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles on rohkem kui üks põhikoostisosa, mille kontsentratsioon on vahemikus 10 %–80 % (massiprotsent). Mitme koostisosaga aine saadakse tootmisprotsessi käigus. Erinevus segu ja mitme koostisosaga aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosaga aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

Nrf2 – Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) on transkriptsioonifaktor, mis on seotud antioksüdatiivse reaktsiooni rajaga. Kui Nrf2 ei ubikvitinüleerita, siis tema kogus tsütoplasmas suureneb ning ta translotseerub tuuma, kus seondub paljude tsütoprotektiivsete geenide promootori ülesvoolujärjestuse piirkonnas asuva sensorvalguga ARE ja käivitab sellega nende transkriptsiooni (8, 10, 11).

Ohtlikkus – mõjuri või olukorra iseloomulik omadus, mis võib põhjustada kahjulikku toimet, kui organism, süsteem või (alam-)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida töödeldakse ainega, mis teadaolevalt kutsub esile positiivse reaktsiooni. Selleks et oleks võimalik hinnata positiivse kemikaali tekitatud reaktsiooni muutumist ajas, ei tohi positiivne reaktsioon olla liiga tugev.

Segu – ainete segu või lahus, mis koosneb kahest või enamast ainest, mis omavahel ei reageeri (1).

Spetsiifilisus – kõikide negatiivsete / inaktiivsete kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega mõõdetakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (29).

Tundlikkus – kõikide positiivsete / reaktsioonivõimeliste kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega mõõdetakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (29).

Täpsus – näitab katsemeetodi tulemuste lähedust kokkulangemisele kinnitatud võrdlusväärtustega (mõõtetäpsus). Täpsusega mõõdetakse katsemeetodi toimivust ja see on üks asjakohasuse aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka kordustäpsuse tähenduses, mis näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (29).

Usaldusväärsus – katsemeetodiga aja jooksul saadud tulemuste laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ulatuse mõõt, kui katset tehakse sama metoodikaga. Seda hinnatakse laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ja laborisisese korduvuse arvutamisega (29).

Uuritav kemikaal – terminit „uuritav kemikaal“ kasutatakse katsealuse kemikaali kohta.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega ained, komplekssed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid.

Valiidne katsemeetod – katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul käsitatakse piisavana ning mis põhineb teaduslikult tõendatud põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi valiidne absoluutses tähenduses, vaid ainult seoses määratud eesmärgiga (29).

▼**M7**

Variatsioonikordaja – hajuvuse mõõt, mis arvutatakse paralleelandmete rühma kohta; selleks jagatakse standardhälve keskväärtusega. Seda saab väljendada protsentides, kui korrutada tulemus sajaga.

Ühe koostisosaga aine – aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles on üks põhikoostisosa, mille kontsentratsioon on vähemalt 80 % (massiprotsent).

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS (*United Nations Globally Harmonized System*, UN GHS)) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ained ja segud) klassifitseerimine füüsikaliste ohutegurite ning tervise- ja keskkonnaohu standarditud tüübi ja -taseme alusel ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, mille eesmärk on edastada teavet kemikaalide kahjulikest toimetest, et kaitsta inimesi (sealhulgas tööandjaid, töötajaid, vedajaid, tarbijaid ja päästetöötajaid) ning keskkonda (1).

▼M7

2. liide

PÄDEVUSE KONTROLLI AINED

Naha sensibiliseerimine *in vitro*: ARE-Nrf2 lutsiferaasi katsemeetod

Enne käesoleva katsemeetodi rutiinset kasutamist tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, kasutades selleks tabelis 1 soovitatud pädevuse kontrolli aineid, et saada nendega õige eeldatav KeratinoSens™ testil põhinev prognoos ning $EC_{1.5}$ ja IC_{50} väärtused, mis jäävad asjakohasesse võrdlusvahemikku vähemalt kaheksa pädevuse kontrolli aine puhul kümnest. Pädevuse kontrolli ained on valitud nii, et need esindaksid naha sensibiliseerimise ohuga seotud eri reaktsioone. Muud valiku kriteeriumid olid kaubanduslik saadavus, kvaliteetse *in vivo* võrdluse olemasolu ning KeratinoSens™ testiga saadud kvaliteetsete *in vitro* andmete kättesaadavus.

Tabel 1

KeratinoSens™ testi kasutamise tehnilise pädevuse tõendamiseks soovitatavad ained

Pädevuse kontrolli ained	CASi nr	Füüsikaline olek	*In vivo* prognoos (1)	KeratinoSens™ testi prognoos (2)	$EC_{1,5}$ (µM) võrdlusvahemik (3)	IC_{50} (µM) võrdlusvahemik (3)
Isopropanool	67-63-0	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	> 1 000	> 1 000
Salitsüülhape	69-72-7	Tahke	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	> 1 000	> 1 000
Piimhape	50-21-5	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	> 1 000	> 1 000
Glütserool	56-81-5	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	> 1 000	> 1 000
Tsinnamüülalkohol	104-54-1	Tahke	Sensibilisaator (nõrk)	Positiivne	25–175	> 1 000
Etüleenglükooldimetakrülaat	97-90-5	Vedelik	Sensibilisaator (nõrk)	Positiivne	5–125	> 500
2-merkaptobensotiasool	149-30-4	Tahke	Sensibilisaator (mõõdukas)	Positiivne	25–250	> 500
Metüüldibromoglutaronitriil	35691-65-7	Tahke	Sensibilisaator (tugev)	Positiivne	< 20	20–100
4-metüülaminofenoolsulfaat	55-55-0	Tahke	Sensibilisaator (tugev)	Positiivne	< 12,5	20–200
2,4-dinitroklorobenseen	97-00-7	Tahke	Sensibilisaator (ülitugev)	Positiivne	< 12,5	5–20

(1) (*In vivo* ohtlikkuse (ja toime tugevuse) prognoos põhineb LLNA andmetel (13). Toime tugevus *in vivo* on tuletatud, kasutades ECETOC-i ette nähtud kriteeriume (24).

(2) KeratinoSens™ testil põhinevat prognoosi tuleb arvesse võtta ühtse lähenemisviisi raamistikus ning kooskõlas selle katsemeetodi punkti 9 ja 11 nõuetega.

(3) Põhineb varasemate katsete andmetel (12).

▼M7

3. liide

LUMINESTSENTSI MÕÕTMISE KVALITEEDIKONTROLL

Põhikatse luminestsentsi mõõtmise optimeerimiseks KeratinoSens™ testis

Järgmised kolm näitajat on kriitilised, et tagada luminomeetriga mõõtmise usaldusväärsed tulemused:

— piisav tundlikkus, et kontrolliga kannude foon oleks stabiilne;

— pikast mõõtmisajast tingitud gradiendi puudumine kogu mikrotiiterplaadi ulatuses ja

— valgussaaste puudumine kannudes, mis asuvad tugeva aktiivsusega kannude kõrval.

Enne katse tegemist on soovitatav tagada asjakohaste luminestsentsi mõõtetulemuste saamine, testides kontrollplaati allpool kirjeldatud proovide paigutusega (kolme paralleelprooviga analüüs).

Esimese õppekatse mikrotiiterplaadi proovide järjestus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0.98**	**EGDMA 1.95**	**EGDMA 3.9**	**EGDMA 7.8**	**EGDMA 15.6**	**EGDMA 31.25**	**EGDMA 62.5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Tühikatse**

EGDMA = etüleenglükooldimetakrülaat (CASi nr 97-90-5), tugev indutseerija

CA = kaneelaldehüüd, positiivne võrdlusproov (CASi nr 104-55-2)

Kvaliteedikontrolli analüüs peab tõendama järgmist:

— D reas on selge annuse-reaktsiooni seos, mille korral I_{max} ületab fooni 20 korda (enamikul juhtudel on I_{max} väärtused vahemikus 100–300);

— C ja E reas puudub seos annuse-reaktsiooni vahel (induktsiooni väärtus ei ületa 1,5 (ideaaljuhul mitte üle 1,3)), mille võiks olla põhjustanud EGDMA rea tugeva aktiivsusega kannude võimalik valgussaaste;

— puudub oluline statistiline erinevus A, B, C, E, F ja G ridade vahel (st mikrotiiterplaadi ulatuses ei esine gradienti); ning

— A, B, C, E, F ja G ridadest igaühe ning H rea DMSOd sisaldavate kannude tulemuste hajuvusvarieeruvus ei ületa 20 % (st foon on stabiilne).

▼M7

B.61. FLUORESTSEIINI LEKKE KATSEMEETOD SILMI SÖÖVITAVATE JA TUGEVALT ÄRRITAVATE KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 460 (2012). Fluorestseiini lekke (FL) katsemeetod on *in vitro* katsemeetod, mida saab teatavatel tingimustel ja konkreetsete piirangutega kasutada kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimiseks silmi söövitavateks ja tugevalt ärritavateks, nagu on määratletud Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni (ÜRO) ühtse ülemaailmse kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1. kategooria), määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus) ([1]) (1. kategooria) ning Ameerika Ühendriikide Keskkonnakaitseametis (*U.S. Environmental Protection Agency*, EPA) (1. kategooria) (1, 2). Selle katsemeetodi jaoks määratletakse silmi tugevalt ärritava toimega kemikaalid kui kemikaalid, mis põhjustavad pärast silma panemist koekahjustuse, mis ei ole pöörduv 21 päeva jooksul, või füüsilise nägemisteravuse suure languse, samas kui silma söövitavad kemikaalid tekitavad silmas pöördumatu koekahjustuse. Sellised kemikaalid klassifitseeritakse vastavalt ÜRO GHSi 1. kategooriasse, ELi CLP-määruse 1. kategooriasse ning U.S. EPA I kategooriasse.

Kuigi FL-katsemeetodit ei käsitata valiidse meetodina, mis asendab täielikult küüliku silma katse *in vivo*, soovitatakse FL-katsemeetodit kasutada astmelise katsetamise strateegia osana kemikaalide regulatiivse klassifitseerimise ja märgistamise jaoks. Seega soovitatakse FL-katsemeetodit ülevalt-alla lähenemisviisi algetapina, millega tehakse kindlaks silmi söövitavad / tugevalt ärritavad kemikaalid, eriti piiratud kemikaalitüüpide puhul (st vees lahustuvad ained ja segud) (3, 4).

Praegu ollakse üldiselt arvamusel, et lähitulevikus ei saa ühegi silmaärrituse *in vitro* katsega asendada *in vivo* silmakatset (katsemeetod B.5 (5)), et prognoosida eri kemikaalirühmade ärritavat toimet kogu ulatuses. Mitme alternatiivse katsemeetodi kombineerimisega (astmelise) katsetamise strateegia raames võib siiski olla võimalik asendada *in vivo* silmakatset (4). Ülevalt-alla lähenemisviisi (4) kasutamist kavandatakse siis, kui olemasoleva teabe alusel on põhjust eeldada, et kemikaalil võib olla tugev ärritav toime.

Punktis 35 üksikasjalikult kirjeldatud prognoosimudeli alusel võib piiratud kohaldatavuse piirkonnas FL-katsemeetodiga kindlaks teha silmi söövitavaid / tugevalt ärritavaid kemikaale (ÜRO GHSi 1. kategooria; ELi CLP-määruse 1. kategooria; U.S. EPA I kategooria), ilma et oleks vaja teha täiendavaid katseid. Sama eeldatakse segude kohta, kuigi segusid ei valideeritud. Seega võib FL-katsemeetodit kasutada selleks, et määrata kemikaalide silmi ärritavat / söövitavat toimet, järgides katsemeetodis B.5 (5) kirjeldatud järjestikuste katsete tegemise strateegiat. Kemikaali, mida ei ole FL-katsemeetodi põhjal prognoositud silmi söövitavaks või tugevalt ärritavaks, tuleks siiski uurida ühe või enama täiendava (*in vitro* ja/või *in vivo*) katsemeetodiga, millega on võimalik õigesti määrata i) kemikaalid, mis on *in vitro* FL-katses silmi söövitava / tugevalt ärritava toime

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼M7

suhtes valenegatiivsed (ÜRO GHSi 1. kategooria; ELi CLP-määruse 1. kategooria; U.S. EPA I kategooria); ii) kemikaalid, mida ei ole klassifitseeritud silmi söövitavaks/ärritavaks (ÜRO GHSi kategooriata; ELi CLP-määruse kategooriata; U.S. EPA IV kategooria); ja/või iii) kemikaalid, mis on mõõduka/nõrga silmi ärritava toimega (ÜRO GHSi kategooriad 2A ja 2B; ELi CLP-määruse 2. kategooria; U.S. EPA kategooriad II ja III).

Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada katsemeetodeid, mida kasutatakse uuritava kemikaali võimaliku silmi söövitava või tugevalt ärritava toime hindamiseks, mõõtes kemikaali võimet tekitada läbilaskmatu konfluentse ühekordse epiteelikihi kahjustust. Normaalse epiteelikaudse läbilaskvuse tagamine on epiteeli, sh side- ja sarvkesta epiteeli peamine funktsioon. Epiteelikaudset läbilaskvust reguleerivad erinevad tiheliidused. Sarvkesta epiteeli läbilaskvuse suurenemise kohta *in vivo* on tõendatud, et see korreleerub silmaärrituse progresseerumisel põletiku taseme ja sedastatava pinnakahjustuse ulatusega.

FL-katsemeetodis kasutatakse Madin-Darby koeraneeru (*Madin-Darby Canine Kidney*, MDCK) rakuliini, mille rakud läbilaskval vahemembraanil kasvatamise korral moodustavad epiteeli monokihi; lühiajaline kokkupuude uuritava kemikaaliga võib suurendada epiteelikihi läbilaskvust naatriumfluorestseiini suhtes; selle suurenemise järgi mõõdetakse toksilist toimet. Lekkinud fluorestseiini kogus on proportsionaalne tiheliiduste, desmosoomiliiduste ja rakumembraani kahjustustega kemikaali toimel ning seda saab kasutada selleks, et hinnata uuritava kemikaali toksilisust silmade suhtes. 1. liites on esitatud joonis, millel on kujutatud vahemembraanil kasvatatavate MDCK rakkudega kambrit, mida kasutatakse fluorestseiini katsemeetodis.

Mõisted on esitatud 2. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

Käesolev katsemeetod põhineb INVITTOXi katsemeetodil nr 71 (6), mida on hinnanud rahvusvahelises valideerimisuuringus Euroopa Alternatiivsete Meetodite Tõestamise Keskus (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, EVCAM) koostöös USA alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomiteega (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) ja alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskusega (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM).

FL-katsemeetodit ei soovitata nende kemikaalide tuvastamiseks, mis tuleb klassifitseerida nõrga/mõõduka ärritava toimega kemikaalideks, või nende kemikaalide puhul, mida ei pea silmaärrituse suhtes klassifitseerima (ained ja segud) (st GHSi kategooria 2A/2B, kategooriata; ELi CLP-määruse 2. kategooria, kategooriata; US EPA II/III/IV kategooria), nagu on tõendatud valideerimisuuringu alusel (3, 7).

See katsemeetod on kohaldatav ainult vees lahustuvate kemikaalide (ained ja segud) uurimiseks. FL-katsemeetodiga saab tavaliselt õigesti prognoosida kemikaalide potentsiaali silmi ärritada, kui nad on vees lahustuvad ja/või kui toksiline toime ei sõltu lahjendusest (7). Selleks, et liigitada kemikaal katsetingimustes vesilahustuvaks, peab see lahustuma steriilses kaltsiumit (kontsentratsioonis 1,0–1,8 mM) sisaldavas fenoolpunaseta Hanki tasakaalustatud soolalahuses (HBSS) kontsentratsioonis $\geq$ 250 mg/ml (järgmine annus pärast läviväärtust 100 mg/ml). Kui uuritav kemikaal lahustub siiski väiksemas kontsentratsioonis kui 100 mg/ml, aga põhjustab fluorestseiini lekke üle 20 % juba sellel kontsentratsioonil (see tähendab, et FL_{20} < 100 mg/ml), võib kemikaali siiski klassifitseerida GHSi 1. kategooriasse või EPA 1. kategooriasse.

Selle katsemeetodi jaoks määratletud piirangutega on kohaldamisvaldkonnast välja arvatud tugevad happed ja alused, rakkude fiksaatorid ja väga lenduvad kemikaalid. Nende kemikaalide toimemehhanisme, näiteks ulatuslikku koagulatsiooni, leeliselist hüdrolüüsi ega spetsiifilisi keemilisi reaktsioone ei saa mõõta FL-katsemeetodiga. Muud selle katsemeetodi kindlaks tehtud piirangud on seotud raskustega prognooside tegemisel värvilise ja viskoosse uuritava kemikaali puhul. Arvatakse, et mõlemat tüüpi kemikaale on pärast lühiajalist kokkupuudet raske

▼M7

rakkude monokihist eemaldada ja et katsemeetodi prognoosivõimet saaks suurendada, kui kasutada suuremat arvu pesemisetappe. Vedelikus suspendeeritud tahketel kemikaalidel on kalduvus sadestuda ning rakkude kokkupuute lõplikku kontsentratsiooni võib olla keeruline määrata. Kui nende keemiliste ja füüsikaliste klasside kemikaalid andmebaasist välja jätta, suureneb FL-meetodi täpsus ELi, EPA ja GHSi klassifitseerimissüsteemide suhtes oluliselt (7).

Selle katsemeetodi eesmärgi (st teha kindlaks ainult silmi söövitavaid / tugevalt ärritavaid kemikaale) suhtes ei ole valenegatiivsete tulemuste osakaal kriitilise tähtsusega, sest selliseid kemikaale uuritakse järgmiseks muude piisavalt valideeritud *in vitro* meetoditega või katsetes küülikutega, sõltuvalt regulatiivsetest nõuetest (vt punkt 13), kasutades järjestikuste katsete tegemise strateegiat koos tõendite kaalukuse lähenemisviisiga (5) (vt ka punktid 3 ja 4).

Muud FL-katsemeetodi kindlaks tehtud piirangud on seotud valenegatiivsete ja valepositiivsete tulemuste osakaaluga. Kui seda katsemeetodit kasutatakse ülevalt-alla lähenemisviisi algetapina, et tuvastada vesilahustuvad silmi söövitavad / tugevalt ärritavad ained ja segud (ÜRO GHSi 1. kategooria; ELi CLP-määruse 1. kategooria; US EPA I kategooria), siis on valepositiivsete osakaal FL-katsemeetodi puhul vahemikus 7 % (7/103; ÜRO GHS ja ELi CLP-määrus) kuni 9 % (9/99; US EPA) ning valenegatiivsete osakaal on vahemikus 54 % (15/28; US EPA) kuni 56 % (27/48; ÜRO GHS ja ELi CLP-määrus), võrreldes *in vivo* tulemustega. FL-katsemeetodiga valepositiivseid ja/või valenegatiivseid tulemusi põhjustanud kemikaalirühmad ei ole siinkohal määratletud.

Teatavad tehnilised piirangud on seotud MDCK rakuliiniga. Värvaine naatriumfluorestseiini läbiminekut monokihist takistavaid tiheliiduseid mõjutab negatiivselt suurenev rakupassaažide arv. Tiheliiduste ebatäielik moodustumine põhjustab fluorestseiini lekke suurenemist töötlemata kontrollis. Seepärast on tähtis kindlaks määratud lubatav maksimaalne leke töötlemata kontrollis (vt punkt 38: leke 0 %). Nagu kõigi *in vitro* katsete puhul on olemas võimalus, et rakud transformeeruvad aja jooksul, seega on ülioluline, et katsete kohta esitataks passaažiarvu vahemikud.

Praegust katse kohaldamisvaldkonda võiks teatud juhtudel laiendada, kuid ainult pärast uuritud kemikaalide suurendatud ning eelistatavalt katsepõhise andmekogumi analüüsimist (3). Kõnealust meetodit ajakohastatakse kooskõlas uue teabe ja andmetega.

Iga käesolevat katsemeetodit juurutav labor peab kasutama 3. liites esitatud pädevuse kontrolli kemikaale. Laborid võivad neid kemikaale kasutada selleks, et tõendada FL-katse tegemise tehnilist pädevust enne FL-katsega saadud andmete esitamist ohu regulatiivseks klassifitseerimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

FL-katsemeetod on tsütotoksilisusel ja rakutalitlusel põhinev *in vitro* katsemeetod, mille tegemiseks kasutatakse konfluentset MDCK CB997 tubulaarse epiteeli rakkude monokihti, mida kasvatatakse poolläbilaskval membraanil ja mis on mitte paljunemisfaasis oleva *in vivo*sarvkesta epiteeli mudel. MDCK rakuliin on tavaliselt kasutatav ning moodustab tiheliiduseid ja desmosoomiliiduseid, mis sarnanevad nendega, mida esineb side- ja sarvkesta epiteeli pealmisel (apikaalsel) poolel. *In vivo* takistavad tihe- ja desmosoomiliidused lahustunud ainetel ja võõrmaterjalil sarvkesta epiteeli läbimist. Tiheliiduste ja desmosoomiliiduste kahjustumisega kaasnev epiteelikaudse läbilaskmatuse kadu on kemikaali põhjustatud silmaärrituse üks esimesi etappe.

▼M7

Uuritav kemikaal lisatakse konfluentsele rakukihile, mida kasvatatakse membraani pealmisel poolel. Tavaliselt kasutatakse lühikest (1 min) kokkupuudet, mis peegeldab kemikaalist puhastumise normaalset kiirust inimese kokkupuute korral. Lühiajalise kokkupuute eelis on see, et vees lahustunud aineid ja segusid saab uurida lahjendamata, kui neid on võimalik pärast kokkupuuteperioodi kergesti eemaldada. See võimaldab tulemuste vahetumat võrdlemist inimese puhul avalduvate keemiliste toimetega. Seejärel eemaldatakse uuritav kemikaal ning lisatakse mittetoksiline intensiivselt fluorestseeruv värvaine naatriumfluorestseiin rakkude monokihi pealmisele poolele 30 minutiks. Uuritava kemikaali põhjustatud tiheliiduste kahjustus määratakse kindlaks rakukihist teatava aja jooksul lekkinud fluorestseiini koguse järgi.

Värvaine naatriumfluorestseiini kogus, mis monokihti ja membraani läbides jõuab kannus olevasse kindla ruumalaga lahusesse (millesse naatriumfluorestseiin lekib), määratakse kannus oleva fluorestseiini kontsentratsiooni spektrofotomeetrilise mõõtmisega. Fluorestseiini leke (FL) arvutatakse võrdlusest fluorestsentsi intensiivsuse kahe kontrolli näitudega – tühikatse ja maksimumlekke kontrolliga. Tiheliiduste kahjustus väljendatakse seega lekke protsendi kaudu võrdlusest nende kontrollidega ja arvutatakse uuritud kemikaali iga ettenähtud kontsentratsiooni kohta. Seejärel arvutatakse FL_{20} (st kontsentratsioon, mis põhjustab fluorestseiini 20protsendilise lekke, võrreldes töötlemata rakkude konfluentse monokihi puhul ja rakkudeta membraani puhul saadud väärtusega). FL_{20} (mg/ml) väärtust kasutatakse prognoosimudelis silmi söövitavate ja tugevalt ärritavate kemikaalide kindlaks tegemiseks (vt punkt 35).

Oluline osa uuritava kemikaali toksilisuse profiilist on rakkude taastumine, mida määratakse ka *in vivo* silmaärrituse katses. Esialgsed analüüsid nähtus, et taastumise andmed (kuni 72 tunnini pärast kokkupuudet kemikaaliga) võiksid suurendada INVITTOXi katsemeetodi nr 71 prognoosivõimet, kuid see vajab täiendavat hindamist ning selleks oleksid kasulikud ka täiendavad andmed, mis eelistatavalt saadakse edasiste katsetega (6). Kõnealust meetodit ajakohastatakse kooskõlas uue teabe ja andmetega.

KATSE KÄIK

Rakkude monokihi valmistamine

MDCK CB997 rakkude monokiht saadakse, kasutades subkonfluentseid rakke, mida kasvatatakse rakukultuuripudelites söötmes DMEM / Nutrient Mix F12 (toitainete segu F12: L-glutamiini, 15 mM HEPESi, kaltsiumi (kontsentratsioonis 1,0–1,8 mM) ja 10 % kuumutamisega inaktiveeritud FCS/FBS (veise loote seerumi) 1 × kontsentraat). Tähtis on, et FL-katses kasutatud sööde / kõik lahused sisaldaksid kaltsiumi kontsentratsioonivahemikus 1,8 mM (200 mg/l) ja 1,0 mM (111 mg/l), et tagada tiheliiduste moodustumine ja terviklikkus. Tuleb reguleerida rakupassaažide arvu vahemikku, et tagada tiheliiduste ühtlane ja korratav moodustumine. Eelistatavalt tuleks kasutada rakke passaažide vahemikus 3–30 pärast sulatamist, sest selle vahemiku rakkude toimivus on sarnane, mis soodustab katsetulemuste korratavust.

Enne FL-katsega alustamist trüpsineeritakse rakud pudeli pinnalt lahti, tsentrifuugitakse ja külvatakse asjakohane arv rakke 24-kannulistesse plaatidesse asetatud membraanidele (vt 1. liide). Rakud tuleb külvata tselluloosi estrite segust tehtud 12mm läbimõõduga membraanile, mille paksus on 80–150 μm ja poori läbimõõt 0,45 μm. Valideerimisuuringus kasutati Millicell-HA 12 mm membraane. Vahemembraani ja membraani tüübi omadused on tähtsad, sest nad võivad mõjutada rakkude kasvu ja keemilist sidumist. Teatavat tüüpi kemikaalid võivad seonduda Millicell-HA vahemembraanile, mis võib mõjutada tulemuste tõlgendamist. Muude kasutatud membraanide samaväärsuse tõendamiseks tuleb kasutada pädevuse kontrolli kemikaale (vt 3. liide).

▼M7

Keemiline seondumine vahemembraaniga on tavalisem katioonsete kemikaalide puhul, nagu bensalkooniumkloriid, mis tõmbuvad laetud membraani poole (7). Keemiline seondumine vahemembraaniga võib pikendada kemikaaliga kokkupuute aega, mis põhjustab selle kemikaali toksilise toime ülehindamist, kuid võib ka füüsiliselt vähendada fluorestseiini leket vahemembraani kaudu, kui värvaine seondub vahemembraaniga, mis põhjustab kemikaali toksilise potentsiaali alahindamist. Seda saab lihtsalt kindlaks teha, kui lisada suurimas kontsentratsioonis uuritavat kemikaali ja seejärel normaalses kontsentratsioonis naatriumfluorestseiini standardajaks ainult vahemembraanile (ilma rakkudeta kontrollproov). Kui värvaine naatriumfluorestseiini seondumine tekib, siis on vahemembraan pärast uuritava materjali mahapesemist kollane. Seega on oluline teada uuritava kemikaali seondumise omadusi, et oleks võimalik tõlgendada selle kemikaali toimet rakkudele.

Rakkude külvamine vahemembraanile peab tagama rakkude konfluentse monokihi kemikaaliga kokkupuute ajal. Vahemembraani kohta tuleb lisada rakke koguses $1{,}6 \times 10^5$ (400 µl rakkude suspensiooni tihedusega 4×10^5 rakku/ml). Nendes tingimustes saavutatakse konfluentse monokihi teke tavaliselt pärast rakkude 96-tunnilist kultiveerimist. Vahemembraane tuleb enne rakkude külvi visuaalselt kontrollida, et olla veendunud, et punktis 30 kirjeldatud visuaalse kontrolliga leitavad kahjustused on tekkinud käsitsemise tõttu.

MDCK rakukultuure tuleb kasvatada inkubaatoris CO_2 sisaldusega 5 % ± 1 % ja sobiva niiskusesisaldusega atmosfääris temperatuuril 37 ± 1 °C. Rakud ei tohi olla saastunud bakterite, viiruste, mükoplasma ega seentega.

Uuritavate ja kontrollkemikaalide pealekandmine

Uuritava kemikaali värske põhilahus tuleb valmistada iga katseseeria jaoks ning kasutada 30 minuti jooksul pärast valmistamist. Uuritavad kemikaalid tuleb valmistada kaltsiumit (kontsentratsioonis 1,0–1,8 mM) sisaldavas fenoolpunaseta HBSSi söötmes, et vältida seerumi valkude seondumist. Enne katse tegemist tuleb hinnata kemikaali lahustuvust HBSSi söötmes kontsentratsioonil 250 mg/ml. Kui sellel kontsentratsioonil moodustab kemikaal 30 minuti jooksul stabiilse suspensiooni või emulsiooni (st lahus säilitab ühetaolisuse ja ei sadestumise ega eraldumise tõttu ei teki täiendavaid faase), võib HBSSi lahustina siiski kasutada. Kui kemikaal osutub HBSSis sellel kontsentratsioonil siiski lahustumatuks, tuleb kaaluda FL-katsemeetodi asemel muu katsemeetodi kasutamist. Kerge mineraalõli kasutamisesse lahustina juhul, kui kemikaal osutub HBSSis lahustumatuks, tuleb suhtuda ettevaatusega, sest ei ole piisavalt andmeid, et teha järeldus FL-katse toimivusest sellistel tingimustel.

Kõik uuritavad kemikaalid valmistatakse põhilahusest võetud steriilses kaltsiumit (kontsentratsioonis 1,0–1,8 mM) sisaldavas fenoolpunaseta HBSSis viies kindlaks määratud kontsentratsioonis, mis saadakse kemikaali lahjendamisel, võttes aluseks massi ruumala kohta: 1, 25, 100, 250 mg/ml ja lahjendamata kemikaal või küllastunud lahus. Kui uuritav kemikaal on tahkis, tuleb lisada ka üks ülisuur kontsentratsioon 750 mg/ml. Selles kontsentratsioonis kemikaali pipeteerimisel rakkudele tuleb võib-olla kasutada kolbpipetti. Kui toksilisus esineb vahemikus 25–100 mg/ml, tuleb järgmisi täiendavaid kontsentratsioone testida kaks korda: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. FL_{20} väärtus tuleb tuletada nendest kontsentratsioonidest eeldusel, et katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud.

Uuritavad kemikaalid kantakse konfluentsele rakkude monokihile pärast rakusöötme eemaldamist ja kahekordset pesemist steriilse sooja (37 °C) kaltsiumit (kontsentratsioonis 1,0–1,8 mM) sisaldava fenoolpunaseta HBSSga. Enne seda on filtreid visuaalselt kontrollitud mis tahes eelnevalt olemasoleva kahjustuse suhtes, mida võiks ekslikult pidada uuritava kemikaaliga kokkusobimatuseks. Uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni ja positiivse kontrolli kohta tuleb igas

▼M7

katseseerias kasutada vähemalt kolme paralleelproovi. Pärast 1minutilist kokkupuudet toatemperatuuril tuleb uuritav kemikaal aspireerides ettevaatlikult eemaldada ning monokihti tuleb kaks korda pesta steriilse sooja (37 °C) kaltsiumit (kontsentratsioonis 1,0–1,8 mM) sisaldava fenoolpunaseta HBSSiga ning kohe mõõta fluorestseiini leket.

Iga katseseeria kohta tuleb kasutada negatiivse kontrolli ja positiivse kontrolli paralleelproove, tõendamaks, et monokihi terviklikkus (negatiivne kontroll) ja rakkude tundlikkus (positiivne kontroll) on varem tehtud katsete alusel kindlaks määratud aktsepteeritavas vahemikus. Soovitatav positiivse kontrolli kemikaal on Brij 35 (CASi nr 9002-92-0) kontsentratsioonis 100 mg/ml. Selle kontsentratsiooniga peaks saama ligikaudu 30protsendilise fluorestseiini lekke (fluorestseiini lekke ehk rakkude kihi kahjustuse aktsepteeritav vahemik on 20–40 %). Soovitatav negatiivse kontrolli kemikaal on kaltsiumit (kontsentratsioonis 1,0–1,8 mM) sisaldav fenoolpunaseta HBSS (ilma uuritava kemikaalita, tühikatse kontroll). Igasse katseseeriasse peab samuti olema lisatud maksimumlekke kontroll, et oleks võimalik arvutada FL_{20} väärtusi. Maksimumleke määratakse, kasutades kontrollina rakkudeta vahemembraani.

Fluorestseiini suhtes läbilaskvuse määramine

Kohe pärast uuritava kemikaali ja kontrolli kemikaalide eemaldamist lisatakse vahemembraanidele (nt Millicell-HA) 400 µl naatriumfluorestseiini lahust kontsentratsioonis 0,1 mg/ml (0,01 %, mass/ruumala) kaltsiumit (kontsentratsioonis 1,0–1,8 mM) sisaldavas fenoolpunaseta HBSSis. Rakukultuure hoitakse 30 minutit toatemperatuuril. Pärast fluorestseiiniga inkubeerimise lõppu eemaldatakse igast kannust ettevaatlikult vahemembraanid. Iga filtrit kontrollitakse visuaalselt ja registreeritakse iga kahjustus, mis võib olla tekkinud käsitsemise ajal.

Läbi monokihi ja vahemembraani lekkinud fluorestseiini kogus mõõdetakse lahusest, mis jääb kannudesse pärast vahemembraani eemaldamist. Mõõdetakse spektrofluoromeetriga ergastuse ja emissiooni lainepikkustel vastavalt 485 nm ja 530 nm. Spektrofluoromeetri tundlikkus tuleb reguleerida nii, et tekiks suurim arvuline erinevus fluorestseiini maksimumlekke (rakkudeta membraan) ja miinimumlekke (negatiivse kontrolliga töödeldud rakkude konfluentse monokihiga membraan) vahel. Kuna kasutatavate spektrofluoromeetrite vahel on erinevusi, soovitatakse kasutada tundlikkust, mille korral fluorestseiini maksimumlekke kontrollis on tekkiva fluorestsentsi intensiivsus > 4 000. Fluorestseiini maksimumlekke väärtus ei tohi olla suurem kui 9 999. Fluorestseiini maksimumlekke intensiivsus peab jääma kasutatava spektrofluoromeetri lineaarsusvahemikku.

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimudel

Fluorestseiini lekke kogus on proportsionaalne kemikaali põhjustatud tiheliiduste kahjustusega. Kemikaali iga uuritud kontsentratsiooni kohta arvutatakse fluorestseiini lekke protsent, lähtudes fluorestseiini lekke väärtustest, mis saadakse uuritava kemikaaliga mõõdetud väärtuse võrdlemisel negatiivse kontrolli fluorestseiini lekke väärtusega (negatiivse kontrolliga töödeldud rakkude konfluentse monokihiga proovi näit) ja maksimumlekke kontrolli väärtusega (rakkudeta vahemembraani kaudu lekkinud fluorestseiini näit).

Maksimumlekke fluorestsentsi intensiivsuse keskväärtus = x

0 % lekke (negatiivne kontroll) fluorestsentsi intensiivsuse keskväärtus = y

100 % lekke keskväärtus saadakse, kui 0 % lekke keskväärtus lahutatakse maksimumlekke keskväärtusest:

$x - y = z$

Iga fikseeritud annuse kohta arvutatakse lekke protsent, lahutades 0 % lekke väärtuse kolme paralleelproovi fluorestsentsi intensiivsuse näitude keskväärtusest (m) ning jagades tulemuse 100 % lekke väärtusega: $\% FL = [(m - y) / z] \times 100\ \%$, kus:

▼M7

M = konkreetse kontsentratsiooni puhul kolmest paralleelproovist mõõdetud fluorestsentsi intensiivsuste keskväärtus

% FL = fluorestseiini protsent, mis lekib läbi rakukihi

Järgmist võrrandit kasutatakse 20 % FL leket põhjustava kontsentratsiooni arvutamiseks:

$$FL_D = [(A–B) / (C–B)] \times (M_C – M_B) + M_B$$

Siin:

D = inhibitsiooni %

A = kahjustuse % (20 % fluorestseiini leket)

B = fluorestseiini lekke % < A

C = fluorestseiini lekke % > A

M_C = C kontsentratsioon (mg/ml)

M_B = B kontsentratsioon (mg/ml)

FL_{20} läviväärtus silmi söövitavate / tugevalt ärritavate kemikaalide prognoosimiseks on esitatud allpool:

FL_{20} (mg/ml)	ÜRO GHSi C&L	ELi CLP-määruse C&L	U.S. EPA C&L
≤ 100	1. kategooria	1. kategooria	I kategooria

C&L: klassifitseerimine ja märgistamine

FL-katsemeetodit soovitatakse ainult vesilahustuvate silmi söövitavate ja tugevalt ärritavate (ÜRO GHSi 1. kategooria, ELi CLP-määruse 1. kategooria, US EPA I kategooria) kindlaks tegemiseks (vt punktid 1 ja 10).

Selleks, et määrata vesilahustuv kemikaal (aine või segu) (3, 6, 7) rasket silmakahjustust tekitavaks (ÜRO GHSi / ELi CLP-määruse 1. kategooria) või silmi söövitavaks või tugevalt ärritavaks (US EPA I kategooria), peab uuritava kemikaaliga tekitatud FL_{20} väärtus olema ≤ 100 mg/ml.

Tulemuste aktsepteerimine

Fluorestseiini maksimumlekke keskväärtus (x) peab olema suurem kui 4 000 (vt punkt 31), 0 % lekke keskväärtus (y) peab võrduma 300-ga või olema sellest väiksem ning 100 % lekke keskväärtus (z) peab jääma vahemikku 3 700–6 000.

Katse loetakse nõuetekohaseks, kui positiivne kontroll tekitab rakukihi 20 %–40 % kahjustuse (mõõdetud fluorestseiini lekke protsendina).

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

Iga katseseeria kohta tuleb tabelina esitada konkreetsete paralleelproovidega kannude andmed (nt fluorestsentsi intensiivsuse väärtused ja arvutatud fluorestseiini lekke protsent iga uuritava kemikaali kohta, sealhulgas klassifikatsioon). Peale selle tuleb esitada iga katseseeria kohta konkreetsete paralleelsete mõõtetulemuste keskväärtused ± SD.

▼M7

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

Uuritavad kemikaalid ja kontrolli kemikaalid

— keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu struktuuripõhine nimetus, mida kasutab Chemical Abstracts Service (CAS), seejärel muud nimetused, kui teada;

— kemikaali CASi number, kui teada;

— aine või segu puhtus ja koostis (massiprotsendina/-protsentidena), selle teabe kättesaadavas ulatuses;

— uuringu läbiviimise seisukohast olulised füüsikalis-keemilised omadused (nt füüsikaline olek, lenduvus, pH, stabiilsus, lahustuvus vees, keemiliste ainete klass, kui teada);

— uuritava kemikaali / kontrolli kemikaali töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

— säilitamistingimused.

Kasutatud meetodi ja metoodika põhjendus

— Peab hõlmama katsemeetodi kohaldamisvaldkonna ja piirangutega seotud kaalutlusi.

Katsetingimused

— Kasutatud rakusüsteemi kirjeldus, sealhulgas autentsussertifikaat ja mükoplasma staatus rakuliinis;

— kasutatud katse-eeskirja üksikasjad;

— uuritava kemikaali kasutatud kontsentratsioon(id);

— uuritava kemikaaliga kokkupuute kestus;

— fluorestseiiniga inkubeerimise kestus;

— kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus;

— kasutatud hindamiskriteeriumide kirjeldus;

— viide mudeli varasemate katsete andmete kohta (st negatiivsed ja positiivsed kontrollid, võrdluskemikaalid, kui asjakohane);

— tõendid labori tehnilise pädevuse kohta.

Tulemused

— Iga katseseeria konkreetse uuritava kemikaali ja kontrollide ning paralleelmõõtmiste tulemused tabelina (sealhulgas konkreetsed mõõtmistulemused, keskväärtused ja SD väärtused);

— tuletatud klassifikatsioon(id) viitega prognoosimudelile ja/või kasutatud otsustamiskriteeriumidele;

— muude täheldatud toimete kirjeldus.

▼**M7**

Tulemuste arutelu

— Peab sisaldama kaalutlusi, mis on seotud ebaselge tulemuse (punkt 35: FL_{20} > 100 mg/ml) ja täiendavate katsete tegemisega.

Järeldused

KIRJANDUS

(1) UN (2009), *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Kättesaadav aadressil: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03-files_e.html]

(2) U.S. EPA (1996), *Label Review Manual:* 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC, U.S. Environmental Protection Agency.

(3) EC-ECVAM (2009), „Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing“.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), „A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches“, *Toxicol. in Vitro* 24, 1–9.

(5) Käesoleva lisa peatükk B.5 *„Äge mürgisus: silmade ärritus/söövitus“*.

(6) EC-ECVAM (1999), „INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test“, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Kättesaadav aadressil: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

(7) EC-ECVAM (2008), „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing“.

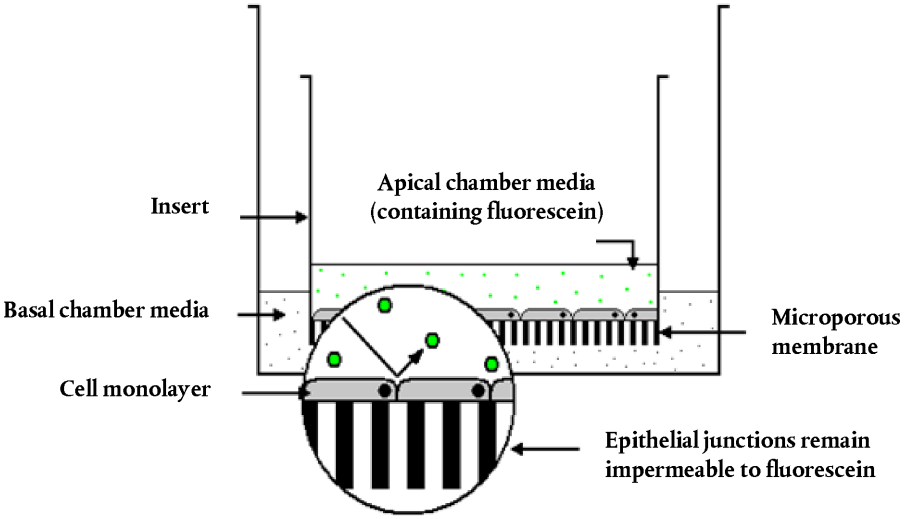
(8) OECD (2005), „Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, *OECD Series on Testing and Assessment* No. 34. OECD, Paris.

▼M7

1. liide

JOONIS. VAHEMEMBRAANIL KASVATATUD MCDK RAKKUDE KASUTAMINE FLUORESTSEIINI LEKKE KATSES

Poolläbilaskval vahemembraanil kasvatatakse MCDK-rakkude konfluentne kiht. Vahemembraan pannakse 24-kannulise plaadi kannu.



Joonise allikas: Wilkinson, P.J. (2006), „Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure“, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, Ühendkunigriik.

▼M7

2. liide

MÕISTED

Aine – ÜRO GHSi kontekstis kasutatuna keemilised elemendid ja nende ühendid, kas looduslikud või tootmisprotsessiga saadud, sealhulgas neis sisalduvad toote stabiliseerimiseks vajalikud lisaained või tootmisprotsessist tulenevad lisandid, välja arvatud lahusti, mida on võimalik eraldada aine stabiilsust mõjutamata ja selle koostist muutmata.

Asendusmeetod – katsemeetod, mis on kavandatud tavakasutuses oleva ohtude tuvastamiseks ja/või riskide hindamiseks heakskiidetud meetodi asendamiseks, ning millega saab tõendatult tagada inimeste või loomade tervise või keskkonna samaväärse või parema kaitse, võrreldes kehtestatud katsemeetodiga kõikide võimalike testimisolukordade ja kemikaalide puhul.

Asjakohasus – huvipakkuva toime ja katse vahelise seose kirjeldus, millest nähtub, kas see seos on tähenduslik ning kasulik konkreetse eesmärgi puhul. See on ulatus, mille piires saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasusega seoses võetakse arvesse ka katsemeetodi täpsust (kordustäpsust) (8).

Astmelise katsetamise strateegia – etapiviisi katsetamise strateegia, milles enne järgmise etapiga alustamist vaadatakse uuritava kemikaali kohta kindlaksmääratud korras läbi kogu olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse analüüsi, et otsustada, kas teave on piisav ohuklassi määramiseks. Kui olemasoleva teabe põhjal saab otsustada uuritava kemikaali ärritavate omaduste üle, ei ole täiendavaid katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa otsustada uuritava kemikaali ärritava toime võimalikkuse üle, jätkatakse järjestikuste loomkatsete etapiti tegemist, kuni kemikaali saab üheselt klassifitseerida.

ELi CLP-määrus (määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist) – selle määrusega rakendatakse Euroopa Liidus (ELis) kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimise ja märgistamise ÜRO süsteem GHS.

EPA I kategooria – EPA I kategooria söövitus (silma kudede pöördumatu kahjustus) või sarvkesta enam kui 21 päeva kestev haaratus või ärritus (2).

FL_{20} – väärtust saab hinnata, kui määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon, millel kemikaal põhjustab fluorestseiini lekke 20 % läbi rakkude monokihi.

Fluorestseiini leke – spektrofluoromeetriliselt mõõdetav rakukihti läbinud fluorestseiini kogus.

GHSi 1. kategooria – silma eesmisele pinnale uuritava kemikaali kandmise järel silma sellise koekahjustuse või tugeva füüsilise nägemislanguse tekkimine, mis ei parane täielikult 21 päeva jooksul pärast kemikaali silmale kandmist.

Kemikaal – aine või segu.

Klassifitseerimata – kemikaalid, mida ei ole klassifitseeritud ÜRO GHSi kategooriatesse 1, 2A või 2B; ELi CLP-määruse 1. või 2. kategooriasse; või US EPA silmi ärritava toimega kemikaalide I, II või III kategooriasse.

Lahusti/vehiikuli kontroll – uuritava kemikaaliga töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või vehiikulit, ja mida töödeldakse samamoodi kui uuritava kemikaaliga töödeldud proovi ja muude kontrollide proove, et määrata samas lahustis või vehiikulis lahustatud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide tekitatud reaktsiooni lähtetaseme väärtus. Kui seda proovi uuritakse paralleelselt negatiivse kontrolli prooviga, siis näitab see, kas lahusti või vehiikul reageerib katsesüsteemiga.

Negatiivne kontroll – uuritava ainega töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Seda proovi käideldakse samaaegselt uuritava kemikaaliga töödeldud proovidega ja muude kontrollide proovidega, et teha kindlaks, kas lahusti reageerib katsesüsteemiga.

▼M7

Ohtlikkus – mõjuri või olukorra iseloomulik omadus, mis võib põhjustada kahjulikku toimet, kui organism, süsteem või (alam-)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida töödeldakse kemikaaliga, mis teadaolevalt kutsub esile positiivse reaktsiooni. Selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli kemikaali toime sõltuvust ajast, ei tohiks toime olla äärmuslik.

Pädevuse kontrolli kemikaalid – võrdluskemikaalide loetelu põhine valik kemikaale, mida katsemeetodit seni mitte kasutanud labor võib kasutada pädevuse tõendamiseks valideeritud võrdlusmeetodiga.

Raske silmakahjustus – pärast uuritava kemikaali kandmist silma eesmisele pinnale silma koekahjustuse või tugeva füüsilise nägemislanguse teke, mis ei parane täielikult 21 päeva jooksul pärast kemikaali silmale kandmist.

Segu – kahe või enama omavahel mitte reageeriva aine segu või lahus ÜRO GHSi kontekstis kasutatuna.

Silmi söövitav aine – a) kemikaal, mis põhjustab silma pöördumatut koekahjustust; b) kemikaalid, mis klassifitseeritakse ÜRO GHSi 1. kategooriasse; ELi CLP-määruse 1. kategooriasse; või US EPA silmi ärritava toimega kemikaalide I kategooriasse.

Silmi tugevalt ärritava toimega kemikaal – a) kemikaal, mis pärast silma eesmisele pinnale kandmist põhjustab silmakoe kahjustuse, mis ei parane 21 päeva jooksul pärast kemikaali silmale kandmist, või põhjustab tugeva füüsilise nägemislanguse; b) kemikaal, mis klassifitseeritakse ÜRO GHSi 1. kategooriasse; ELi CLP-määruse 1. kategooriasse; või US EPA silmi ärritava toimega kemikaalide I kategooriasse.

Silmi ärritava toimega kemikaal – a) kemikaal, mis pärast silma eesmisele pinnale kandmist põhjustab selle pöörduva muutuse; b) kemikaal, mis klassifitseeritakse ÜRO GHSi kategooriasse 2A või 2B; ELi CLP-määruse 2. kategooriasse; või US EPA silmi ärritava toimega kemikaalide II või III kategooriasse.

Spetsiifilisus – kõikide negatiivsete / inaktiivsete kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Sellega mõõdetakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel.

Tundlikkus – kõikide positiivsete / toimet avaldavate kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega mõõdetakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (8).

Tõendite kaalukuse analüüs – protsess, milles kemikaali võimaliku ohtlikkuse üle otsustamisel ja sellise otsuse toetamisel võetakse arvesse mitmesuguste andmete tugevaid ja nõrku külgi.

Täpsus – näitab katsemeetodi tulemuste lähedust kokkulangemisele kinnitatud võrdlusväärtustega (mõõtetäpsus). Täpsusega mõõdetakse katsemeetodi toimivust

▼M7

ja see on üks asjakohasuse aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka kordustäpsuse tähenduses, mis näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse.

Usaldusväärsus – katsemeetodiga aja jooksul saadud tulemuste laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ulatuse mõõt, kui katset tehakse sama metoodikaga. Seda hinnatakse laborisisese ja laboritevahelise korratavuse ja laborisisese korduvuse arvutamisega.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valenegatiivsete tulemuste osakaal – kõikide positiivsete kemikaalide osakaal, mis on katsemeetodiga ekslikult määratud negatiivseks. See on katsemeetodi toimivuse üks näitajaid.

Valepositiivsete tulemuste osakaal – kõikide negatiivsete kemikaalide osakaal, mis on katsemeetodiga ekslikult määratud positiivseks. See on katsemeetodi toimivuse üks näitajaid.

Valideeritud katsemeetod – katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi suhtes. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei pruugi olla täpsuse ja usaldusväärsuse suhtes piisava toimivusega, et seda saaks aktsepteerida konkreetse eesmärgi puhul (8).

ÜRO GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*) ehk ÜRO ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimis- ja märgistamissüsteem – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ained ja segud) klassifitseerimine füüsikaliste ohutegurite ning tervise- ja keskkonnaohu standarditud tüübi ja -taseme alusel ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, mille eesmärk on edastada teavet kemikaalide kahjulikest toimetest, et kaitsta inimesi (sealhulgas tööandjaid, töötajaid, vedajaid, tarbijaid ja päästetöötajaid) ning keskkonda (1).

▼M7

3. liide

FL-KATSEMEETODI PÄDEVUSE KONTROLLI KEMIKAALID

Enne käesoleva katsemeetodi tavakasutamist peab labor tõendama tehnilist pädevust ning määrama õigesti tabelis 1 soovitatud kemikaalidest 8 kemikaali kohta silmi söövitava toime klassifikatsiooni. Need kemikaalid on valitud nii, et nad esindaksid silma paikse söövituse / ärritava toime reaktsioonide vahemikku, mis põhineb *in vivo* küüliku silma katsega (katsejuhend nr 405, katsemeetod B.5 (5)) (st ÜRO GHSi 1. kategooria; 2A, 2B kategooria või klassifitseerimata). Võttes arvesse FL-katse valideeritud kasulikkust (st ainult silmi söövitavate / tugevalt ärritavate kemikaalide määramine), on klassifitseerimise seisukohast siiski pädevuse tõendamiseks olemas vaid kaks katse tulemust (söövitava / tugevalt ärritava toimega kemikaal või mittesöövitav/mitteärritav kemikaal). Kemikaalide valiku muud kriteeriumid olid kaubanduslik kättesaadavus, kvaliteetsete *in vivo* võrdlusandmete olemasolu ja FL-katsega saadud kvaliteetsete andmete olemasolu. Sel põhjusel valiti pädevuse kontrolli kemikaalid artikli „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing“ (8) alusel, mida kasutati FL-katsemeetodi retrospektiivseks valideerimiseks.

Tabel 1

FL-katsemeetodi jaoks tehnilise pädevuse tõendamiseks soovitatavad kemikaalid

Kemikaal	CASi nr	Kemikaaliklass ([1])	Füüsikaline olek	*In vivo* klassifikatsioon ([2])	*In vitro* klassifikatsioon ([3])
Bensalkooniumkloriid (5 %)	8001-54-5	Ooniumühend	Vedelik	1. kategooria	Söövitav / tugevalt ärritav
Prometasiin-vesinikkloriid	58-33-3	Amiin/amidiin, heterotsükliline, orgaaniline väävliühend	Tahke	1. kategooria	Söövitav / tugevalt ärritav
Naatriumhüdroksiid (10 %)	1310-73-2	Leeline	Vedelik	1. kategooria	Söövitav / tugevalt ärritav
Naatriumlaurüülsulfaat (15 %)	151-21-3	Karboksüülhape (sool)	Vedelik	1. kategooria	Söövitav / tugevalt ärritav
4-karboksübensaldehüüd	619-66-9	Karboksüülhape, aldehüüd	Tahke	Kategooria 2 (A)	Mittesöövitav / mitte tugevalt ärritav
Ammooniumnitraat	6484-52-2	Anorgaaniline sool	Tahke	Kategooria 2 (A)	Mittesöövitav / mitte tugevalt ärritav
Etüül-2-metüülatseto-atsetaat	609-14-3	ketoon, ester	Vedelik	Kategooria 2 (B)	Mittesöövitav / mitte tugevalt ärritav
Glütserool	56-81-5	alkohol	Vedelik	Kategooriata	Mittesöövitav / mitte tugevalt ärritav

Lühendid: CASi nr = Chemical Abstracts Service'i number

([1]) Iga uuritava aine kemikaaliklass määrati standardse klassifitseerimisskeemi alusel, mis põhineb USA riikliku meditsiiniraamatukogu (*National Library of Medicine*) tesauruse MeSH (*Medical Subject Headings*) klassifikatsioonisüsteemil (vt http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Põhineb küüliku *in vivo* silmakatse (OECD katsejuhend nr 405, katsemeetod B.5) tulemustel ning selles kasutatakse ÜRO GHSi ja ELi CLP-määrust (4, 6).

([3]) Põhineb FL-katsemeetodiga saadud tulemustel (INVITTOX Protocol No. 71).

▼M7

B.62. **LEELISELINE *IN VIVO* KOMEEDIKATSE IMETAJARAKKUDEGA**

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 489 (2016). Leeliselist *in vivo* komeedikatset (üksikraku geelelektroforeesi, edaspidi lihtsalt „komeedikatse“) kasutatakse võimalike genotoksiliste materjalidega kokkupuutunud loomade, tavaliselt näriliste eri kudedest eraldatud rakkudes või rakutuumades DNA-ahelate katkemiste määramiseks. Paljud eksperdirühmad on komeedikatse läbi vaadanud ja avaldanud oma soovitused (1–10). Käesolev katsemeetod on üks osa geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seerias. Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (11).

Komeedikatse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis põhjustavad DNA kahjustusi. Leeliselises keskkonnas (pH > 13) saab komeedikatse abil avastada DNA üksikahelalisi või kaksikahelalisi katkemisi, mis tulenevad näiteks kemikaali otsesest toimest DNA-le, leelise suhtes tundlikest kohtadest või ajutistest DNA katkemistest, mis on seotud DNA väljalõikereparatsiooniga. Need ahelate katkemised võidakse parandada, ilma et neist jääks püsimõju, need võivad olla raku jaoks surmavad või võib nende reparatsioon põhjustada mutatsiooni, mille tulemusel tekib elusrakus säiliv püsimuutus. Need võivad põhjustada ka kromosoomikahjustust, mis on seotud mitmete inimhaigustega, sealhulgas vähiga.

Närilistega tehtava *in vivo* komeedikatse ametliku valideerimise katsed tehti aastatel 2006–2012, neid koordineeris alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskus (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM) koostöös alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskusega (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM), alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomiteega (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) ja (Ameerika Ühendriikide) riikliku toksikoloogiaprogrammi (NTP) alternatiivsete toksikoloogiameetodite ametitevahelise keskusega (National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) (12). Käesolevas katsemeetodis on esitatud komeedikatse soovituslik kasutusala ja piirangud, ning selle aluseks on valideerimiskatsetes kasutatud lõplik eeskiri (12) koos täiendavate asjakohaste avaldatud ja avaldamata (laboritele kuuluvate) andmetega.

Peamiste terminite määratlused on esitatud 1. liites. Tuleb märkida, et käesoleva katse tegemiseks on palju erinevaid tehnilisi lahendusi (mikroskoobi alusklaasid, geelilaigud, 96-kannulised plaadid jne). Mugavuse mõttes kasutatakse käesolevas dokumendis edaspidi mõistet „alusklaas“, kuid see hõlmab ka kõiki muid lahendusi.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

Komeedikatse on meetod, millega mõõdetakse DNA ahelate katkemisi eukarüootsetes rakkudes. Üksikrakud/-rakutuumad pannakse alusklaasile agaroosi sisse ja lüüsitakse detergendi ning suure kontsentratsiooniga soolalahusega. Selle lüüsietapiga lõhutakse raku- ja tuumamembraanid ning vabastatakse spiraalselt keerdunud DNA-lingud, mida üldiselt kutsutakse nukleoididеks, ja DNA-fragmendid. Elektroforeesil suure pH tingimustes tekivad komeete meenutavad struktuurid, mida saab sobiva fluorestseeruva värvainega värvitult vaadelda fluorestsentsmikroskoopia abil; DNA-fragmendid liiguvad vastavalt oma suurusele komeedi „peast“ eemale „sabasse“ ning komeedi saba suhteline intensiivsus, võrreldes summaarse intensiivsusega (pea pluss saba), iseloomustab DNA katkemiste määra (13–15).

Leeliseline *in vivo* komeedikatse on eriti asjakohane genotoksilise ohtlikkuse hindamisel, kuna selle katse tulemused sõltuvad *in vivo* imendumisest, jaotumisest, metabolismist ja eritumisest ning ka DNA reparatsiooni protsessidest. Need omadused võivad eri liikidel ja kudedel olla erinevad ja sõltuda ka DNA kahjustuse tüübist.

▼**M7**

Loomade heaolu nõuete täitmiseks, eelkõige loomade kasutamise vähendamiseks (nn 3Ri – *Replacement, Reduction, Refinement* – ehk loomkatsete asendamise, vähendamise ja täiustamise põhimõtted) võib selle katse ühendada muude toksikoloogiauuringutega, näiteks korduvdoosi toksilisuse uuringutega (10, 16, 17); samuti võib mõõdetavaid näitajaid kombineerida muude genotoksilisuse näitajatega nagu mikrotuumade tekke *in vivo* katse imetajate erütrotsüütidega (18–20). Kõige sagedamini tehakse komeedikatset närilistega, kuigi seda on kasutatud ka muude imetajate ja mitteimetajate liikide puhul. Muude liikide kui närilised kasutamine peab olema teaduslikult ja eetiliselt igal üksikjuhtumil põhjendatud ning soovitatakse tungivalt, et komeedikatset ei kasutataks muudel loomaliikidel kui närilised eraldi katsena, vaid ainult kombineeritult muu toksilisuse uuringuga.

Kokkupuuteviisi ning uuritava koe valik peaks olema määratud kogu uuritava kemikaali kohta olemasoleva teabe põhjal, näiteks inimese kavandatav või oletatav kokkupuude, kemikaali metabolism ja jaotumine, toime võimalikkus kokkupuutekohas, struktuuriga seotud hoiatused, muud genotoksilisuse või toksilisuse andmed ning uuringu eesmärk. Seega võib vajaduse korral hinnata uuritava kemikaali genotoksilisust kantserogeense või muu toksilise toime sihtkoe suhtes. Seda peetakse kasulikuks ka *in vitro* katsega kindlaks tehtud mutageense mõju täiendaval uurimisel. *In vivo* komeedikatse tegemine huvipakkuva sihtkoega on asjakohane, kui võib põhjendatult eeldada, et huvipakkuv kude puutub piisavalt kemikaaliga kokku.

Katset on kõige põhjalikumalt valideeritud isaste rottide somaatilistes kudedes sellistes uuringutes nagu JaCVAMi uuring (12) ning Rothfussi jt artikkel aastast 2010 (10). JaCVAMi rahvusvahelises valideerimisuuringus kasutati maksa ja magu. Maksa kasutati seepärast, et see on kõige aktiivsemalt kemikaali metabolismis osalev elund ning sageli ka kantserogeenide sihtelund. Magu kasutati seepärast, et see on tavaliselt esimene kemikaaliga kokkupuutekoht pärast suukaudset manustamist, kuigi muid seedetrakti osi nagu kaksteistsõrmiksoolt või tühisoolt tuleks samuti pidada kemikaaliga kokkupuutekoha kudedeks, mis inimese seisukohast on vahest asjakohasemad kui näriliste näärmemagu. Tuleks jälgida, et koed ei puutuks kokku uuritava kemikaali ülemäära suure kontsentratsiooniga (21). Meetod on üldiselt kohaldatav igale koele, millest saab teha analüüsitavaid üksikrakkude või tuumade suspensioone. Mitme labori puhul nähtub intellektuaalse omandi õigusega kaitstud andmetest, et katset saab edukalt kasutada paljude eri kudede puhul; samuti on palju avaldatud töid selle kohta, et see meetod töötab ka muude elundite ja kudede kui maks ja magu puhul, näiteks tühisoole (22), neeru (23, 24), naha (25, 26) või kusepõie (27, 28) rakud, kopsude ja bronhoalveolaarse lavaaži rakud (mis on asjakohased sissehingatavate kemikaalide puhul) (29, 30); katseid on tehtud korraga ka mitme elundi rakkudega (31, 32).

Kuigi võib olla huvitav uurida genotoksilist mõju sugurakkudele, tuleb siiski märkida, et käesolevas katsemeetodis kirjeldatud standardset leeliselist komeedikatset ei peeta sobivaks DNA katkete uurimiseks küpsetes sugurakkudes. Kuna kirjanduse ülevaates avaldati DNA-kahjustuste suured ja muutuvad tausttaseme väärtused komeedikatse kasutamise puhul sugurakkude genotoksilisuse uurimiseks (33), peetakse vajalikuks, et enne komeedikatse kasutamist küpsete sugurakkude (nt spermide) puhul tuleks katse-eeskirja selleks kohandada ning teha tõhusamaid standardimise ja valideerimise uuringuid. Peale selle ei ole käesolevas katsemeetodis kirjeldatud ja soovitatud kokkupuuterežiim optimaalne, sest spermide DNA-ahelate katkete tähenduslikuks analüüsiks oleks vaja pikemat kokkupuudet või pikemaid proovivõtuaegu. Kirjanduses (34, 35) on kirjeldatud munandirakkudele diferentseerumise eri staadiumides avalduva genotoksilise toimet, mida on uuritud komeedikatse abil. Tuleks siiski märkida, et sugunäärmed sisaldavad somaatiliste ja sugurakkude segu. Seetõttu ei peegelda terviksugunäärme (munandi) positiivsed tulemused tingimata sugurakkude kahjustust; siiski näitavad need, et uuritav kemikaal ja/või selle metaboliidid on jõudnud sugunäärmesse.

▼M7

Komeedikatse tavapärastes tingimustes ei ole usaldusväärselt võimalik kindlaks teha ristsidemeid. Teatavates muudetud katsetingimustes võib tuvastada DNA-DNA ja DNA-valgu ristsidemeid ning muid aluste muutusi nagu oksüdeeritud alused (23, 36–39). Kuid on vaja täiendavaid uuringuid, et piisavalt hästi kirjeldada, mis muudatusi tuleks metoodikas teha. Ristsidemeid põhjustavate ainete tuvastamine ei ole seega siinkirjeldatud katse peamine eesmärk. Katse, isegi muudatustega, ei sobi aneugeenide kindlakstegemiseks.

Praeguse teadmiste tasemega seoses on *in vivo* komeedikatsega seotud veel täiendavaid piiranguid (vt 3. liide). Eeldatakse, et katsemeetod vaadatakse tulevikus läbi ja seda muudetakse vajaduse korral, et võtta arvesse saadud kogemusi.

Enne meetodi kasutamist kavandatud regulatiivsel eesmärgil segu kohta andmete saamiseks tuleks kaaluda, kas, ja kui jah, siis miks võib see anda adekvaatseid tulemusi sellisel juhul. Selliseid kaalutlusi ei ole vaja, kui regulatiivse nõudega nähaksegi ette segu katsetamine.

MEETODI PÕHIMÕTE

Loomadele viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse asjakohase manustamistee kaudu. Doosi valimise ja proovide võtmise üksikasjalik kirjeldus on esitatud punktides 36–40. Valitud proovivõtuajal (-aegadel) prepareeritakse huvipakkuv kude ja valmistatakse üksikrakkude/-rakutuumade suspensioonid (vajaduse korral võib kaaluda näiteks maksa *in situ* perfusiooni) ning alusklaasidel immobiliseerimiseks viiakse need pehmesse agarisse. Rakke/tuumi töödeldakse lüüsipuhvriga, et kõrvaldada raku- ja või tuumamembraanid, ning tugevalt leelise pH-ga, st $\geq$ 13, et DNA keerduks lahti ning vabaneksid relakseerunud DNA-lingud ja -fragmendid. Tuuma DNA-le agaris tehakse seejärel elektroforees. Normaalsed fragmenteerumata DNA-molekulid jäävad agaris samale kohale, kus oli tuuma DNA, samas kui DNA-fragmendid ja relakseerunud DNA-lingud hakkavad liikuma anoodi poole. Pärast elektroforeesi muudetakse DNA nähtavaks sobiva fluorestseeruva värviga. Preparaate tuleb analüüsida mikroskoobi abil, kasutades kas kujutise analüüsi pool- või täisautomaatset süsteemi. Elektroforeesi ajal migreerunud DNA määr ja liikumistee pikkus näitavad tekkinud DNA-fragmentide kogust ja suurust. Komeedikatse puhul määratakse mitut näitajat. DNA-kahjustuse hindamiseks on soovitatud kasutada sabas oleva DNA kogust (sabas oleva DNA % ehk saba intensiivsuse %) (12, 40–42). Pärast piisava arvu tuumade analüüsimist analüüsitakse andmeid asjakohaste meetoditega, et hinnata katse tulemusi.

Tuleks märkida, et meetodi eri aspektide muutmist, sealhulgas proovi ettevalmistamise, elektroforeesi tingimuste, visuaalse analüüsi parameetrite (nt värvimise intensiivsuse, mikroskoobilambi valguse intensiivsus, samuti mikroskoobifiltrite ja kaamera liikumise) ning keskkonnatingimuste (nt taustavalgustuse) muutmist on uuritud ja näidatud, et see võib mõjutada DNA migreerumist (43–46).

LABORI PÄDEVUSE KONTROLLIMINE

Iga labor peaks tõendama komeedikatse tegemise eksperimentaalset pädevust, milleks on vaja tõendada, et ta suudab iga kasutatava loomaliigi puhul saada iga sihtkoe üksikrakkude või -tuumade piisava kvaliteediga suspensioone. Preparaatide kvaliteeti hinnatakse eelkõige sabas oleva DNA % järgi vehiikuliga kokkupuutesse viidud loomade puhul – see % peab jääma reprodutseeritavalt väiksesse vahemikku. Praegused andmed näitavad, et rotimaksa rühma keskmine sabas oleva DNA % (põhineb mediaanide keskväärtusel – vt nende terminite üksikasjalik selgitus punkt 57) ei tohiks ületada 6 %, mis on kooskõlas JaCVAMi valideerimiskatse (12) ning muude avaldatud ja intellektuaalse omandi õigusega kaitstud andmetega. Praegu ei ole piisavalt andmeid soovituste andmiseks selle kohta, milline peaks olema parim või vastuvõetav vahemik muude kudede puhul. See ei välista muude kudede kasutamist, kui see on põhjendatud. Katseprotokollis tuleks esitada asjakohane ülevaade komeedikatse toimivusest nende kudede puhul

▼M7

seoses kirjanduses avaldatud andmete või intellektuaalse omandi õigusega kaitstud andmetega. Esiteks on sabas oleva DNA % väike vahemik kontrollide puhul soovitav sellepärast, et sellega jääb piisav dünaamiline vahemik positiivse mõju avastamiseks. Teiseks peab iga labor suutma korrata eeldatavaid vastuseid erineva toimemehhanismiga otseste mutageenide ja pro-mutageenidega, nagu on soovitatud tabelis 1 (punkt 29).

Positiivseid aineid võib valida näiteks JaCVAMi valideerimiskatsest (12) või muudest avaldatud andmetest (vt punkt 9) ja kui asjakohane, lisada põhjendus ning näidata, et on saadud selged positiivsed vastused huvipakkuvate kudede puhul. Samuti tuleks näidata, et labor suudab määrata tuntud mutageeni, näiteks EMSi, väikese doosi põhjustatud nõrka toimet, milleks määratakse näiteks doosi-reaktsiooni seos vajaliku arvu ja sobivate intervallidega dooside põhjal. Esialgu tuleks keskenduda pädevuse tõendamisele kõige sagedamini kasutatavate kudede, nt näriliste maksa puhul, kus eeldatavaid tulemusi võib võrrelda olemasolevate andmetega (12). Samal ajal tuleks koguda andmeid muude kudede, näiteks mao/kaksteistsõrmiku/tühisoole, vere jne kohta. Labori pädevust tuleb tõendada eraldi iga loomaliigi iga koe puhul, mida kavatsetakse uurida, ning tuleb tõendada, et teadaoleva mutageeniga (näiteks EMSiga) saadakse kõnealuses koes aktsepteeritav positiivne reaktsioon.

Tuleb koguda vehiikuli/negatiivse kontrolli andmeid, et näidata negatiivse mõju korratavust ning tagada, et katse tehnilisi aspekte on nõuetekohaselt kontrollitud, või et saada teada vajadusest koostada uued varasemate kontrolli katsete vahemikud (vt punkt 22).

Tuleks märkida, et kuigi lahangu ajal võib võtta mitmeid kudesid ja töödelda neid komeedikatse tegemiseks, peab labor olema pädev mitmetest kudedest proovide võtmises samalt loomalt; sellega tagatakse, et ükski võimalik DNA-kahjustus ei lähe kaduma ja komeedikatse annab usaldusväärseid tulemusi. Ajavahemik eutanaasiast kuni kudede eemaldamiseni töötlemiseks võib olla kriitilise tähtsusega (vt punkt 44).

Käesoleva katsega seotud pädevuse arendamisel tuleb pidada silmas loomade heaolu ja seepärast võib katse mitmesuguste aspektides pädevuse saavutamiseks kasutada muudes katsetes kasutatud loomadelt saadud kudesid. Lisaks sellele ei pruugi olla vajalik viia läbi täielikku uuringut sel ajal, kui labor juurutab uut katsemeetodit; vajalike oskuste arendamiseks võib kasutada vähem loomi või uuritava kemikaali kontsentratsioone.

Varasemad kontrolli andmed

Pädevuse tõendamise uuringute ajal peab labor koostama varasemate tulemuste andmebaasi, et kehtestada positiivse ja negatiivse kontrolli tulemuste vahemikud ning jaotused asjakohaste kudede ja liikide puhul. Soovitused selle kohta, kuidas koostada ja kasutada varasemaid andmeid (st varasemate andmete andmebaasi lisamise või sealt väljajätmise kriteeriumid, varasemate andmete ja konkreetse katse nõuetekohasuse kriteeriumid) võib leida kirjandusest (47). Eri kudede, eri liikide, samuti eri vehiikulite ja manustamisviiside korral võib sabas oleva DNA % negatiivse kontrolli katses olla erinev. Seepärast on oluline määrata iga koe ja iga loomaliigi puhul negatiivse kontrolli väärtuste vahemik. Labor peab kasutama

▼M7

kvaliteedikontrolli meetodeid, nagu kontrollkaardid (näiteks vastavuskontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (48)), et näha, kui varieeruvad on labori andmed, ja näidata, et meetod on laboris „kontrolli all“. Sobivate positiivse kontrolli ainete, doosivahemike ja eksperimendi tingimuste (näiteks elektroforeesi jaoks) valimist võib olla vaja ka optimeerida, et määrata nõrka toimet (vt punkt 17).

Iga muutust katse-eeskirjas tuleb kaaluda seoses nende ja labori olemasolevate varasemate kontrolli tulemuste andmebaasi kooskõlaga. Iga suurema vastuolu tekkimisel tuleb koostada uus varasemate kontrolli tulemuste andmebaas.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Loomaliigi valimine

Harilikult kasutatakse tavaliste näriliste laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi (vanus 6–10 nädalat katse alguses, kuigi lubatud on ka veidi vanemad loomad). Näriliseliigi valikul tuleks eelistada järgmisi liike: i) liik, mida kasutatakse muudes toksilisuse uuringutes (et andmeid saaks võrrelda ja uuringuid omavahel kombineerida), ii) liik, millel kantserogeensuse uuringus tekivad kasvajad (kantserogeensuse mehhanismi uurimisel), või iii) liik, mille puhul uuritava kemikaali metabolism on kõige asjakohasem inimese metabolismi seisukohast, kui see on teada. Käesolevas katses kasutatakse tavaliselt rotte. Siiski võib kasutada ka muid liike, kui see on eetiliselt ja teaduslikult põhjendatud.

Loomade pidamise ja söötmise tingimused

Temperatuur katseloomade ruumis peab olema 22 ± 3 °C. Suhteline õhuniiskus peaks ideaaljuhul olema vähemalt 50–60 %, seejuures vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Kasutatakse tehisvalgustust, valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut koos piiramatus koguses joogiveega. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali sobiv lisamine söödasse, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Närilisi tuleb pidada väikestes rühmades, kuni viis samast soost looma, kui ei eeldata agressiivset käitumist. Loomi võib ühekaupa pidada ainult siis, kui see on teaduslikult põhjendatud. Võimaluse korral tuleks alati kasutada kõva pinnaga põrandat, kuna metallvõrgust puuripõrand võib põhjustada raskeid vigastusi (49). Tuleb tagada sobivad keskkonna mitmekesistamise vahendid.

Loomade ettevalmistamine

Loomad jaotatakse kontroll- ja katserühmadesse juhuslikkuse alusel. Loomad märgistatakse kordumatu tähisega ja lastakse neid enne kemikaaliga kokkupuutumist vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Kordumatuks tähistamiseks tuleb kasutada kõige vähem invasiivset meetodit. Sobivad meetodid on rõngastamine, märgise kinnitamine, mikrokiipimine ja biomeetriline identifitseerimine. Varba köndistamine ja kõrva sälkamine ei ole teaduslikult põhjendatud nende katsete puhul. Puurid paigutatakse nii, et nende asukohast tingitud võimalikud mõjud oleksid minimaalsed. Uuringu alguses peaksid loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ja ei tohiks ületada ± 20 %.

Dooside valmistamine

Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada või suspendeerida sobivas vehiikulis ja segada sööda sisse või joogivette enne loomadele andmist. Vedelat uuritavat kemikaali võib manustada vahetult või lahjendada enne manustamist. Sissehingamise kaudu toimuva kokkupuute korral manustatakse uuritavat kemikaali gaasi, auru või tahke/vedela dispersse faasiga aerosoolina, sõltuvalt kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest (50, 51).

▼M7

Tuleks kasutada uuritava kemikaali värskeid valmistisi, kui kemikaali stabiilsuse andmetest ei ilmne, et säilitamine on aktsepteeritav ja on määratletud asjakohased säilitamistingimused.

Katsetingimused

Vehiikul

Vehiikul ei tohiks avaldada toksilist toimet kasutatava doosi ruumala korral ega keemiliselt reageerida uuritava kemikaaliga. Kui kasutatakse tuntud vehiikulist erinevat ainet, peab võrdlusandmetega olema näidatud, et see on sobiv nii katseloomade, manustamistee kui ka määratava näitaja seisukohast. Kui vähegi võimalik, on kõigepealt soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti/vehiikuli kasutamist. Tuleks märkida, et mõned (eriti viskoossed) vehiikulid võivad tekitada põletikku ja suurendada DNA-ahela katkete taustnivood kokkupuutekohas, eriti mitmekordse manustamise puhul.

Kontrollid

Positiivsed kontrollid

Praegusel ajal tuleks igas katses kasutada positiivse kontrolli rühma, milles on vähemalt 3 ühest soost analüüsitavat looma või 3 looma kummastki soost, kui kasutatakse mõlemast soost loomi (vt punkt 32), kes viiakse kokkupuutesse positiivse kontrolli ainega. Tulevikus võib olla võimalik tõendada piisavat tehnilist pädevust ja vähendada vajadust positiivse kontrolli järele. Kui kasutatakse mitut proovivõtuaega (nt ühekordse manustamise eeskirja puhul), on vaja teha positiivse kontrolli katse ainult ühel proovivõtuajal, kuid tuleb tagada, et katseplaan oleks tasakaalus (vt punkt 48). Paralleelse positiivse kontrolli aineid ei ole tingimata vaja manustada samal viisil kui uuritavat kemikaali, kuid kui uuritakse paikset toimet kokkupuutekohas, siis on oluline kasutada sama manustamisviisi. Tuleb näidata, et positiivse kontrolli aine põhjustab DNA-ahela katkemist kõikides kudedes, mis on uuritava kemikaali puhul huvipakkuvad, ja kuna EMS põhjustab DNA-katkeid kõikides uuritud kudedes, on EMS tõenäoliselt hea positiivse kontrolli aine. Positiivse kontrolli doosid tuleks valida nii, et toime oleks mõõdukas, mis võimaldab kriitiliselt hinnata katse toimivust ja tundlikkust, ning dooside valik võiks põhineda doosi-toime kõveratel, mis labor on koostanud pädevuse tõendamise ajal. Positiivse kontrolli loomade puhul peaks sabas oleva DNA % olema kooskõlas varem laboris iga koe ja iga proovivõtuaja jaoks kindlaks määratud vahemikuga (vt punkt 16). Positiivse kontrolli ained ja mõned näited nende sihtkudede kohta (näriliste puhul) on esitatud tabelis 1. Muid aineid kui tabelis 1 esitatud ained võib valida siis, kui see on teaduslikult põhjendatud.

Tabel 1

Positiivse kontrolli ainete ja mõnede nende sihtkudede näited

Aine ja CASi nr
Etüülmetaansulfonaat (CASi nr 62-50-0) – kõik koed
Etüülnitrosokarbamiid (CASi nr 759-73-9) – maks, magu, kaksteistsõrmik või tühisool
Metüülmetaansulfonaat (CASi nr 66-27-3) – maks, magu, kaksteistsõrmik või tühisool, kopsude ja bronhoalveolaarse lavaaži (BAL) rakud, neerud, kusepõis, kopsud, munandid ja luuüdi/veri
N-metüül-*N*′-nitro-*N*-nitrosoguanidiin (CASi nr 70-25-7) – magu, kaksteistsõrmik, tühisool
1,2-dimetüülhüdrasiin·2HCl (CASi nr 306-37-6) – maks ja sool
N-metüül-*N*-nitrosokarbamiid (CASi nr 684-93-5) – maks, luuüdi, veri, neerud, magu, tühisool ja aju.

▼M7

Negatiivsed kontrollid

Negatiivse kontrolli loomade rühm, kellele manustatakse üksnes vehiikulit ja keda muus suhtes koheldakse samamoodi kui katserühmi, peab olema igas katses iga proovivõtuaja ja iga koe puhul. Negatiivse kontrolli loomade puhul peaks sabas oleva DNA % olema varem laboris selle loomaliigi iga koe jaoks ja iga proovivõtuaja jaoks kindlaks määratud vahemikus (vt punkt 16). Kui ei ole varasemaid või kirjanduses avaldatud kontrolli andmeid, mis näitavad, et valitud vehiikulil ei ole kahjulikku ega genotoksilist toimet samasuguse manustamiskordade arvu või manustamistee korral, tuleb vehiikuliga teha eelkatsed enne täieliku uuringu tegemist, et tõendada vehiikuli kontrolli vastuvõetavust.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

Kuigi emasloomade kohta on olemas vähe andmeid selleks, et võrrelda komeedikatse tulemuste põhjal omavahel sugusid, on muud genotoksilisuse *in vivo* toimed isas-ja emasloomadel üldiselt sarnased ja seepärast võiks enamiku katseid teha ükskõik kummast soost loomadega. Kui andmetest, sealhulgas doosivahemiku määramise katse andmetest nähtuvad asjakohased erinevused isas- ja emasloomade vahel (nt süsteemse toksilisuse, metabolismi, biokättesaadavuse jne erinevused), tuleb katsetes kasutada kummastki soost loomi. Sellisel juhul võib olla asjakohane viia uuring läbi kummastki soost loomadega, näiteks korduvdoosi toksilisuse uuringu osana. Kui kasutatakse kummastki soost loomi, võib olla asjakohane teha katse mitut faktorit määrata võimaldava katseplaani järgi. Üksikasjad selle kohta, kuidas sellise katse andmeid analüüsida, on esitatud 2. liites.

Rühmade suurus uuringu alguses (ja pädevuse tõendamise ajal) tuleks seada eesmärgiga tagada igas rühmas vähemalt 5 analüüsitava ühest soost looma olemasolu või 5 kummastki soost looma olemasolu, kui kasutatakse kummastki soost loomi (paralleelses positiivse kontrolli rühmas võib olla vähem loomi, vt punkt 29). Kui inimese kokkupuude kemikaaliga on soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse vastavast soost loomadega. Kui esitada mingi juhis loomadega seotud võimalikult tüüpiliste maksimumnõuete kohta katses, mis tehakse vastavalt punktis 33 esitatud parameetritele kolme doosirühma ning paralleelsete negatiivse ja positiivse kontrolli rühmadega (igas rühmas on viis samast soost looma), siis kulub selleks 25–35 looma.

MANUSTAMISKAVA

Loomadele tuleks kemikaali manustada iga päev kahe või enama päeva jooksul (st kaks või enam manustamist ligikaudu 24 tunniste vaheaegadega); proovid võetakse üks kord pärast 2–6 tunni möödumist viimasest manustamisest (või ajal T_{max}) (12). Lubatav on kasutada dooside pikaajalise manustamise (näiteks iga päev 28 päeva jooksul) režiimi korral saadavaid proove. On tõendatud, et komeedikatset saab edukalt kombineerida erütrotsüütides mikrotuumade tekke katsega (10, 19). Hoolikalt tuleb siiski kaaluda komeedikatse jaoks koeproovide võtmise logistika kokkusobivust muude toksikoloogiliste hindamiste jaoks koeproovide võtmise nõuetega. Proovide võtmine 24 tundi pärast viimase doosi manustamist, mis on tüüpiline üldise toksilisuse uuringute puhul, ei ole komeedikatse puhul enamikul juhtudest vastuvõetav (vt punkt 40 proovivõtuaegade kohta). Muude annustamis- ja proovivõtukavade kasutamine peab olema põhjendatud (vt 3. liide). Näiteks ühekordset manustamist koos mitme proovi võtmisega võib kasutada, kuid tuleb siiski märkida, et ühekordse manustamisega uuringu jaoks on vaja rohkem loomi, kuna proove tuleb võtta eri ajavahemike tagant; mõnikord võib see olla eelistatav, nt siis, kui uuritav kemikaal on korduval manustamisel ülemäära toksiline.

▼M7

Olenemata katse tegemise viisist on see vastuvõetav, kui uuritav kemikaal põhjustab positiivse reaktsiooni, või negatiivse uuringu puhul, kui on otsesed või kaudsed tõendid sihtkoe või -kudede kokkupuutest, sihtkoele avalduvast toksilisusest või kui saavutatakse piirdoos (vt punkt 36).

Uuritavaid kemikaale võib manustada ka jagatud doosina, näiteks kaks doosi ühel päeval kuni 2–3-tunnise vahega, et hõlbustada suure ruumalaga koguse manustamist. Nimetatud asjaoludel peaks kavandatud proovide võtmise kord põhinema viimase doosi manustamise ajal (vt punkt 40).

Doosid

Vastavalt praegusele arusaamale doosivahemiku määramise uuringu tegemise kohta tuleks sellisel juhul, kui tehakse vahemiku määramise eeluuring, sest muude uuringutega ei ole saadud sobivaid andmeid vahemiku valimise hõlbustamiseks, teha uuring samas laboris, kasutades sama liiki, liini, samast soost loomi ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuuringus. Uuringu eesmärk on kindlaks määrata maksimaalne talutav doos (*maximum tolerated dose*, MTD), mis määratletakse doosina, mis põhjustab uuringu ajal vähest toksilist toimet (näiteks selgeid kliinilisi sümptomeid nagu ebaharilik käitumine või reaktsioonid, väike kehamassi langus või tsütotoksilisus sihtkoe suhtes), kuid mitte surma või sellist valu, piinlemist või kannatusi, mille puhul läheks vaja eutanaasiat. Mittetoksilise uuritava kemikaali puhul, kui manustamisaeg on 14 päeva või rohkem, on suurim (piir-) doos 1 000 mg / kehamassi kg kohta päevas. Kui manustamisaeg on lühem kui 14 päeva, on suurim (piir-) doos 2 000 mg / kehamassi kg kohta päevas. Teatud tüüpi uuritavate kemikaalide (näiteks inimravimid) puhul, millele kohaldatakse eripiiranguid, võivad need piirid olla teistsugused.

Kemikaalide puhul, mille toksiko-kineetilistes omadustes esineb küllastumist, või mis põhjustavad selliseid detoksifitseerimisprotsesse, mis võivad vähendada kokkupuudet pärast pikaajalist manustamist, võib olla vajalik teha erandeid doosi määramise kriteeriumidest ja neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi.

Komeedikatse nii akuutse kui ka subakuutse toksilisuse versiooni puhul tuleb lisaks suurimale doosile (*maximum feasible dose*, MTD, maksimaalne kokkupuude või piirdoos) valida iga proovivõtuaja jaoks kahanevas järjekorras veel vähemalt kaks doosiväärtust (mis eelistatavalt erinevad üksteisest vähem kui 10), et tõendada doosist sõltuvuse olemasolu. Kasutatavate doosidega tuleb siiski katta vahemik suurimast talutavast doosist kuni doosini, mis on vähetoksiline või mittetoksiline. Kui kõikide katses kasutatud dooside korral täheldatakse toksilisust sihtkoe suhtes, on soovitatav uurida veel mittetoksilisi doose (vt punktid 54–55). Kui uuringuga tahetakse põhjalikumalt uurida doosi-toime sõltuvuse kuju, võib olla vajalik lisada täiendavaid doosirühma(sid).

Dooside manustamine

Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese võimalikku kokkupuuteviisi. Seepärast võib lugeda põhjendatuks selliste kokkupuuteviiside valimist nagu toidu, joogivee või paikse pealekandmise kaudu, samuti nahaaluse, veenisisese, suukaudse (toitmissondiga), inhalatsiooniga, intratrahheaalselt või implanteerimisega manustamise kaudu. Igal juhul tuleb manustamisviis valida nii, et tagada sihtkoe (-kudede) piisav kokkupuude uuritava kemikaaliga. Intraperitoneaalset süstimist tavaliselt ei soovitata, kuna see ei ole inimese puhul tüüpiline kokkupuuteviis; seda võib kasutada ainult konkreetse põhjenduse olemasolul (nt mõned positiivse kontrolli ained, uurimiseesmärkidel või mõne ravimi korral, mida manustatakse intraperitoneaalselt). Vedeliku suurim kogus, mida saab toitmissondi kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Ruumala ei tohiks ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kui võib kasutada ruumala 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema ruumala

▼M7

kasutamise korral (kui see on lubatud loomade heaolu käsitlevate õigusaktidega) tuleb seda põhjendada. Alati kui võimalik tuleks eri doositasemed saavutada uuritava kemikaali kontsentratsiooni muutmisega manustatava lahuse koostises, et tagada kõikide dooside puhul lahuse ruumala ja kehamassi ühesugune suhe.

Proovivõtuaeg

Proovivõtuaeg on kriitilise tähtsusega muutuja, kuna see on määratud ajavahemikuga, mis on vajalik uuritava kemikaali maksimaalse sisalduse saavutamiseks sihtkoes ja DNA-ahela katkete tekkeks; samas tuleb proov võtta enne, kui katked kõrvaldatakse, parandatakse või kui rakk nende tõttu sureb. Mõned kahjustused, mis põhjustavad DNA-ahela selliseid katkemisi, mida saab määrata komeedikatsega, võivad olla väga lühiealised, vähemalt mõne kemikaali testimisel *in vitro* (52, 53). Kui kahtlustatakse selliseid ajutisi DNA-kahjustusi, tuleks võtta meetmed nende kaotsimineku vähendamiseks; selleks tuleb kudedest proovid võtta piisavalt varakult, võib-olla varem kui pärast allpool esitatud vaikimisi ajavahemike möödumist. Optimaalne proovivõtuaeg võib sõltuda kemikaalist või manustamisteest; näiteks võib sihtkoe kokkupuude alata kiiresti pärast veenikaudset manustamist või kokkupuudet sissehingamise kaudu. Seega tuleks proovivõtuajad määrata kineetiliste andmete alusel (nt aeg (T_{max}), kui saavutatakse maksimaalne kontsentratsioon veres või koes (C_{max}) või statsionaarse oleku saabumisel mitmekordse manustamise korral), kui kineetilised andmed on olemas. Kineetiliste andmete puudumisel on sobiv kompromiss võtta genotoksilisuse mõõtmiseks proovid 2–6 tundi pärast viimast manustamist kahe või enama manustamise korral või nii 2–6 tundi kui ka 16–26 tundi pärast ühekordset manustamist, kuigi tuleb jälgida, et kõik loomad lahataks ühel ja samal ajal pärast viimase (või ainsa) doosi manustamist. Sobiva proovivõtuaja määramiseks võib kasutada (selle olemasolul) ka teavet sihtorganitele avalduva toksilise toime avaldumise kohta.

Vaatlus

Loomade tervise kliinilisi üldvaatlusi tuleb teha ja registreerida vähemalt üks kord päevas, soovitatavalt iga päev samal ajal, võttes arvesse pärast annustamist eeldatavate toimete kõrgperioodi (54). Haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks tuleb kemikaali manustamise perioodil kõik loomad vähemalt kaks korda päevas üle vaadata. Pikema kestusega uuringute puhul tuleb kõiki loomi kaaluda vähemalt kord nädalas ja katse lõpus. Sööda tarbimist tuleb mõõta igal sööda vahetamisel ja vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist mõõta pärast iga veevahetust ja vähemalt üks kord nädalas. Loomad, kellel avalduvad ülemäärase toksilisuse sümptomid, mis ei ole surmavad, tuleb humaanselt hukata enne katse lõppu; selliseid loomi komeedikatses tavaliselt ei kasutata.

Uuritavate kudede valimine

Kuna DNA-ahelate katkemisi (komeete) on võimalik uurida praktiliselt iga koe puhul, peaks koe (kudede) valiku põhjendus olema selgelt määratletud ning põhinema uuringu tegemise eesmärgil, võttes arvesse ka kõiki olemasolevaid andmeid uuritava kemikaali imendumise, jaotumise, metabolismi ja eritumise, genotoksilisuse, kantserogeensuse ja muu toksilise toime kohta. Olulised tegurid, mida tuleks kaaluda, peaksid hõlmama vähemalt järgmist: uuritava kemikaali manustamisviis (põhineb inimeste tõenäolisel kokkupuuteviisil), eeldatav jaotumine kudedes ja imendumine, metabolismi osatähtsus ja võimalik toimemehhanism. Kõige sagedamini on uuritud maksa ja selle organi kohta on kõige rohkem andmeid. Seepärast, kui ei ole taustteavet ja ei ole määratletud konkreetset huvipakkuvat kude, on põhjendatud maksaproovide võtmine, kuna see on peamine

▼M7

ksenobiootikumide metaboliseerimise koht ning intensiivses kokkupuutes nii lähteaine(te) kui ka metaboliidi(metaboliitidega). Mõnel juhul võib kõige asjakohasem olla uurida otsese kokkupuute kohta (nt kemikaali suukaudse manustamise korral näärmemagu, kaksteistsõrmik või tühisool; sissehingamise teel manustamise korral kopsud). Täiendavate või alternatiivsete kudede valimisel tuleks lähtuda katse tegemise konkreetsetest põhjustest, kuid kasulik võib olla ka sama looma mitme koe uurimine, kui labor on tõendanud pädevust uurida neid kudesid ja pädevust uurida neid samaaegselt.

Proovide valmistamine

Järgmistes punktides (44–49) kirjeldatud protsesside puhul on oluline, et kõiki lahuseid või stabiilseid suspensioone kasutataks enne nende kasutustähtaja lõppu või need oleksid vajaduse korral värskelt valmistatud. Järgmistes punktides on ajad, mis kuluvad i) iga koe eemaldamiseks pärast lahkamist, ii) igast koest raku/tuumade suspensiooni valmistamiseks ja iii) suspensiooni töötlemiseks ja alusklaaside valmistamiseks, kõik samuti kriitilise tähtsusega muutujad (vt mõisted, 1. liide) ja iga etapi läbimiseks vastuvõetav ajavahemik tuleb määrata katsemeetodi juurutamise ja pädevuse tõendamise katsete ajal.

Loomad hukatakse humaansel viisil, mis on kooskõlas loomade heaolu käsitlevate kehtivate õigusaktidega ning loomkatsete asendamise, vähendamise ja täiustamise põhimõtetega, sobival ajal pärast uuritava kemikaali viimast manustamist. Valitud kude (koed) eemaldatakse ning osa võetakse komeedikatse jaoks; samal ajal ja samast kohast tuleb lõigata samasugune osa koest ja panna formaldehüüdi lahusesse või muusse sobivasse fiksatiivi võimaliku histopatoloogilise analüüsi jaoks (vt punkt 55) vastavalt standardmeetodile (12). Komeedikatseks võetud kude pannakse peenestamispuhvrisse, loputatakse piisava põhjalikkusega külma peenestamispuhvriga, et eemaldada verejäägid ja hoitakse jääkülmas peenestamispuhvris kuni töötlemiseni. Võib kasutada ka *in situ* perfusiooni, nt maksa või neeru korral.

Rakkude/tuumade isoleerimise kohta on avaldatud palju meetodeid. Nende hulka kuuluvad maksa ja neerude puhul kasutatav peenestamine, mao-soolestiku puhul limaskesta kaapimine, homogeenimine ja ensüümidega lõhustamine. JaCVAMi valideerimisuuringus uuriti ainult isoleeritud rakke ja seepärast on seoses meetodi juurutamisega ja võimalikkusega viidata ja pädevuse tõendamise ajal JaCVAMi uuringule eelistatav kasutada isoleeritud rakke. Siiski on näidatud, et katse tulemustes ei olnud olulist erinevust, kui isoleeritud rakkude asemel kasutati tuumasid (8). Võrreldavad tulemused saadi ka siis, kui rakkude/tuumade isoleerimiseks kasutati eri meetodeid (nt homogeenimine, peenestamine, ensümaatiline lõhustamine või filtrimine läbi võrgu) (55). Järelikult võib kasutada kas isoleeritud rakke või isoleeritud tuumasid. Laboril tuleb põhjalikult hinnata ja valideerida üksikrakkude/-tuumade isoleerimise koespetsiifilised meetodid. Nagu on arutatud punktis 40, võivad mõned kahjustused, mis viivad DNA-ahela selliste katkemisteni, mida saab määrata komeedikatsega, olla väga lühiealised (52, 53). Seepärast on oluline, et olenemata üksikrakkude/-tuumade suspensiooni valmistamiseks kasutatavast meetodist töödeldaks koed pärast loomade eutanaasiat võimalikult kiiresti ning säilitataks neid tingimustes, milles kahjustuste kõrvaldamine väheneks (nt koe hoidmine madalal temperatuuril). Rakususpensioone tuleks hoida jääkülmana kuni kasutamiseni, nii et eri proovide vahelised erinevused oleksid minimaalsed ja et positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes saadaks asjakohased tulemused.

▼M7

MIKROSKOOBIPREPARAATIDE VALMISTAMINE

Mikroskoobipreparaadid tuleb valmistada võimalikult kiiresti (soovitatavalt ühe tunni jooksul) pärast üksikrakkude/-tuumade proovi valmistamist, kuid loomade surma ja mikroskoobipreparaadi valmistamise vaheline aeg peab olema rangelt kontrollitud ja valideeritud iga labori tingimustes. Mikroskoobipreparaatide valmistamisel ei tohiks rakususpensiooni ruumala, mis lisatakse madala sulamispunktiga agaroosile (tavaliselt 0,5–1,0 %), vähendada madala sulamistemperatuuriga agaroosi osakaalu alla 0,45 %. Optimaalne rakkude tihedus määratakse kujutise analüüsi süsteemi abil, mida kasutatakse komeetide hindamisel.

Lüüsimine

Ka lüüsimistingimused on kriitilise tähtsusega muutuja ja võivad takistada selliseid ahelakatkemisi, mis tulenevad teatud tüüpi DNA-muutustest (teatavad DNA alküülimised ja aluseaduktid). Seepärast on soovitatav, et lüüsimistingimused oleksid võimalikult ühesugused katse kõikide preparaatide valmistamisel. Kui preparaadid on valmis, tuleb alusklaasid panna jahutatud lüüsimislahusesse vähemalt üheks tunniks (või järgmise hommikuni) temperatuuril ligikaudu 2–8 °C nõrga valgustuse (nt kollane valgus) tingimustes (või täielikus pimeduses), et vältida kokkupuudet valge valgusega, mis võib sisaldada UV-komponente. Pärast seda inkubatsiooniperioodi tuleks alusklaasid loputada, et eemaldada detergendi jäägid ja soolad, enne kui alustatakse leeliselise lahtikeerdumise etappi. Seda võib teha puhastatud vee, neutraliseerimispuhvri või fosfaatpuhvri abil. Kasutada võib ka elektroforeesipuhvrit. See säilitaks leeliselised tingimused elektroforeesikambris.

Lahtikeerdumine ja elektroforees

Alusklaasid tuleks panna juhuslikus järjestuses elektroforeesiseadme platvormile, mis on täielikult kaetud elektroforeesilahusega ja milles lahust on nii palju, et alusklaasid oleksid kogu aeg täielikult lahusega kaetud (ka katva kihi paksus peaks eri katsetes olema ühesugune). Komeedikatse tegemisel teist tüüpi elektroforeesiseadmetes, st aktiivse jahutamise, jahutusvee tsirkulatsiooni ja suure võimsusega toiteallika abil, põhjustab paksem lahusekiht suurema voolutugevuse, kui pinge hoitakse samasugune. Alusklaaside panemisel elektrolüüsivanni tuleks kasutada tasakaalustatud lahendust, et leevendada igasuguste trendide või ääreefektide mõju ühes elektrolüüsivannis ja vähendada ka eri vannide kasutamisest tulenevat varieeruvust; see tähendab, et igas elektrolüüsikatses peab olema ühesugune arv alusklaase igalt uuringus kasutatud loomalt ja ühesugune arv proove igast doosirühmast, negatiivse ja positiivse kontrolli rühmast. Alusklaasid tuleks jätta vähemalt 20 minutiks lahusesse, et DNA keerduks lahti ning seejärel tehakse elektroforees kontrollitud tingimustes, millega katse tundlikkus ja dünaamiline vahemik viiakse maksimumini (et saavutada negatiivse ja positiivse kontrolli puhul sabas oleva DNA protsendi vastuvõetav tundlikkust maksimeeriv tase). DNA migreerumise tase on lineaarselt seotud elektroforeesi kestusega ja ka pingepotentsiaaliga (V/cm). JaCVAMi uuringu põhjal võiks pingepotentsiaal olla 0,7 V/cm vähemalt 20 minuti jooksul. Elektroforeesi kestust loetakse kriitilise tähtsusega muutujaks ja elektroforeesi aeg tuleks valida nii, et dünaamiline vahemik oleks optimaalne. Pikem elektroforeesi aeg (nt 30 või 40 minutit, et saavutada maksimaalset tundlikkust) põhjustab tavaliselt tugevama positiivse toime teadaolevate mutageenide puhul. Kuid pikk elektroforeesiaeg võib põhjustada ka kontrolli proovide ülemäärast migreerumist. Iga katse puhul tuleks kasutada ühesugust pinget ning muude näitajate varieerumine peaks olema teadaolevas kitsas vahemikus; näiteks JaCVAMi uuringus põhjustas pingepotentsiaal

▼M7

0,7 V/cm lähtevoolutugevuse 300 mA. Puhverlahusekihi paksust tuleks kohandada, et saavutada vajalikud tingimused ja hoida neid kogu katse vältel. Voolutugevus elektroforeesi alguses ja lõpus tuleb registreerida. Seepärast tuleb labori algsete pädevuse tõendamise katsete ajal määrata iga uuritava koeliigi jaoks optimaalsed tingimused. Elektroforeesilahuse temperatuur kogu lahtikeerdumise ja elektroforeesi ajal peab olema madal, tavaliselt 2–10 °C (10). Elektroforeesilahuse temperatuur lahtikeerdumise alguses, elektroforeesi alguses ja lõpus tuleb registreerida.

Pärast elektroforeesi lõppu tuleb alusklaasid panna neutraliseerimispuhvrisse või neid sellega loputada vähemalt 5 minutit. Geele võib värvida ja hinnata „värskelt“ (nt 1–2 päeva jooksul) või need võib veetustada hilisemaks hindamiseks (nt 1–2 nädalat pärast värvimist) (56). Need tingimused peavad siiski olema valideeritud pädevuse tõendamise ajal; samuti tuleb koguda varasemaid andmeid ning säilitada need eraldi iga tingimuste komplekti jaoks. Viimasel juhul tuleks alusklaasid dehüdrateerida paigutamisega absoluutsesse etanooli vähemalt 5 minutiks, lasta kuivada õhu käes ja hoida seejärel kas toatemperatuuril või külmikus kuni hindamiseni.

Mõõtmismeetodid

Komeete tuleb hinnata kvantitatiivselt, kasutades automaatset või poolautomaatset kujutiseanalüüsi süsteemi. Mikroskoobipreparaadid värvitakse sobiva fluoresteeruva värvainega, nagu SYBR Gold, Green I, propiidiumjodiid või etiidiumbromiid ja mõõdetakse sobiva suurendusega (nt 200 korda) epifluorestsentsmikroskoobiga, mis on varustatud vajalike detektoritega või digikaameraga (nt CCD).

Rakud võib liigitada kolme kategooriasse, nagu on kirjeldatud komeedikujutiste atlases (57), nimelt hindamiskõlblik komeet, hindamist mitte võimaldav ja „siil“ (*hedgehog*,vt edasine arutelu, punkt 56). Artefaktide vältimiseks tuleb sabas oleva DNA % määramiseks hinnata ainult hindamiskõlblikke rakke (millel on selgelt määratletud pea ja saba ning mida ei mõjuta segavalt naaberrakud). Katseprotokollis ei ole vaja esitada andmeid selle kohta, kui palju oli hindamist mitte võimaldavaid rakke. Nn siilide sagedus tuleks kindlaks määrata nende visuaalse hindamise põhjal (kuna selgelt määratletud pea puudumine tähendab, et kujutise analüüsiga võivad need jääda tuvastamata) vähemalt 150 raku hulgas ühe proovi kohta) (vt edasine arutelu, punkt 56) ja registreerida eraldi.

Kõik alusklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollide omad, kodeeritakse sõltumatult ja neid hinnatakse „pimesi“, nii et hindaja ei tea proovi töötlemise tingimusi. Iga proovi kohta (ühe looma ühe koe kohta) tuleb analüüsida vähemalt 150 rakku (välja arvatud nn siilid, vt punkt 56). Smithi jt (2008) (5) analüüsi kohaselt annab piisava statistilise võimsuse 150 raku hindamine vähemalt 5 looma puhul igas doosirühmas (väiksema loomade arvu juures samaaegse positiivse kontrolli rühmas, vt punkt 29). Kui kasutatakse alusklaase, tuleks hinnata 2–3 alusklaasi proovi kohta, kui kasutatakse viiest loomast koosnevaid doosirühmi. Alusklaasil tuleb vaadelda mitut piirkonda, kus rakkude tihedus tagab selle, et sabad ei kattu. Alusklaasi serval asuvate alade hindamist tuleb vältida.

DNA-ahelate katkemisi komeedikatses võib mõõta erinevate sõltumatute näitajate järgi, sabas oleva DNA %, saba pikkus ja saba moment. Sobiva kujutiste analüüsi tarkvarasüsteemi abil võib mõõta kõik kolm näitajat. Siiski soovitatakse hindamiseks ja tulemuste tõlgendamiseks kasutada sabas oleva DNA protsenti (nimetatakse ka saba intensiivsuse protsendiks) (12, 40–42), mis määratakse sabas olevate DNA-fragmentide intensiivsuse järgi ja väljendatakse protsendina raku summaarsest intensiivsusest (13).

▼M7

Koekahjustus ja tsütotoksilisus

Komeedikatse positiivsed tulemused ei pruugi olla tingitud üksnes genotoksilisusest; DNA migreerumise suurenemist võib põhjustada ka sihtkoe suhtes avalduv toksilisus (12, 41). Ja vastupidi, teadaolevate genotoksiinide korral võidakse täheldada madalat või mõõdukat tsütotoksilisust (12), mis tõendab, et komeedikatse üksinda ei võimalda eristada genotoksilisusest tingitud DNA migreerumise sellisest DNA migreerumisest, mille põhjustab tsütotoksilisus. Ent sellisel juhul, kui täheldatakse DNA migreerumise suurenemist, on soovitatav, et määrataks ka tsütotoksilisuse üks või mitu näitajat, kuna see võib aidata tulemusi tõlgendada. Kui koos DNA migreerumise suurenemisega esinevad selged tõendid tsütotoksilisusest tuleks suurenemise tõlgendamisel olla ettevaatlik.

Tsütotoksilisuse mõõtmiseks on soovitatud palju meetodeid ja nendest peetakse histopatoloogiliste muutuste uurimist koe suhtes avalduva toksilisuse määramise asjakohaseks meetodiks. DNA suurenenud migreerumisega seostatakse selliseid leide nagu põletik, rakkude infiltratsioon, apoptootilised või nekrootilised muutused, kuid nagu näitas JaCVAMi valideerimisuuring (12), ei ole olemas selliste histopatoloogiliste muutuste kindlat loendit, mis oleksid alati seotud DNA migreerumise suurenemisega. Muutused kliinilise keemia näitajates (nt AST, ALT) võivad samuti anda kasulikku teavet koekahjustuste kohta ning kaaluda võib ka täiendavaid näitajaid, nagu kaspaasi aktiveerumine, värvumine TUNELiga, värvumine anneksiin V-ga jne. Vähe andmeid on avaldatud siiski viimaste kasutamise kohta *in vivo* uuringutes ja mõned neist võivad olla vähem usaldusväärsed kui teised.

Nn siilid (või „pilved“ (*clouds*), „kummitusrakud“ (*ghost cells*)) on rakud, mille mikroskoobikujutisel on väike pea või seda ei olegi ning suured hägusad sabad; neid peetakse tugevasti kahjustatud rakkudeks, kuigi „siilide“ tekkimise põhjused on ebaselged (vt 3. liide). Nende välimuse tõttu ei ole sabas oleva DNA % mõõtmised kujutise analüüsi abil usaldusväärsed ja seetõttu tuleks „siile“ hinnata eraldi. „Siilide“ esinemine tuleb märkida ja esitada protokollis ning kõiki asjakohaseid suurenemisi, mida seostatakse uuritava kemikaali mõjuga, tuleks analüüsida ja tõlgendada ettevaatlikult. Teadmised uuritava kemikaali võimaliku toimemehhanismi kohta võivad aidata selliseid tulemusi tõlgendada.

KATSEANDMED JA NENDE ESITAMINE

Andmete töötlemine

Katseühik on üks loom ja seepärast tuleb tabelitena esitada nii andmed iga üksiku looma kohta kui ka koondandmed. Andmete hierarhilise olemuse tõttu soovitatakse iga alusklaasi puhul määrata sabas oleva DNA protsendi mediaanväärtus ja iga looma puhul arvutada mediaanväärtuste keskväärtus (12). Seejärel leitakse üksikloomade keskväärtuste keskmine iga doosirühma jaoks. Kõik need väärtused tuleb esitada katseprotokollis. Võib kasutada ka alternatiivseid lähenemisviise (vt punkt 53), kui see on teaduslikult ja statistiliselt põhjendatud. Statistilise analüüsi võib teha mitmesuguste lähenemisviiside abil (58–61). Kasutatava statistilise meetodi valimisel tuleb kaaluda, kas andmeid on vaja teisendada (näiteks logaritmimine või ruutjuurteisendus) ja/või kas on vaja liita kõikidele (ka nullist erinevatele) arvudele mingi väike arv (nt 0,001), et leevendada nulliga võrduvate rakuväärtuste mõju, nagu on kirjeldatud eespool nimetatud viidetes. Üksikasjalikud juhendid, kuidas analüüsida töötlusega seotud ja soospetsiifilise muutujate interaktsioone, kui katses kasutatakse mõlemast soost loomi, ning saadud andmete edasist analüüsi, kui neis leitakse või ei leita erinevusi, on esitatud 2. liites. Protokollis tuleks esitada ka andmed toksilisuse kohta ja kliinilised sümptomid.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Katse nõuetekohaseks tunnistamine põhineb järgmistel kriteeriumidel:

a. Samaaegne negatiivse kontrolli katse loetakse nõuetekohaseks ja vastuvõetavaks labori varasemate negatiivse kontrolli katsete andmebaasi kandmiseks vastavalt punktis 16 kirjeldatud kriteeriumidele.

▼M7

b. Samaaegne positiivse kontrolli katse (vt punkt 29) peab kutsuma esile sellise mõju, mis on kooskõlas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaasi kohase mõjuga ja peaks endast kujutama statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes samaaegse negatiivse kontrolli katse tulemusega.

c. Analüüsitud on piisav arv rakke ja doose (vt punktid 52 ja 36–38).

d. Suurima doosi valiku kriteeriumid vastavad punktis 36 kirjeldatutele.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

Tingimusel et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui:

a. vähemalt ühe uuritud doosi korral on leitud statistiliselt oluline suurenemine võrreldes samaaegse negatiivse kontrolliga,

b. suurenemine sõltub doosist, kui seda hinnatakse sobiva trendikatsega,

c. kõik tulemused on väljaspool varasemate katsete negatiivse kontrolli tulemuste jaotusvahemikku konkreetse liigi, vehiikuli, manustamisviisi, koe ja manustamiskordade arvu puhul.

Kui kõik need tingimused on täidetud, loetakse uuritav kemikaal võimeliseks põhjustama DNA-ahelate katkemisi kudedes, mida uuriti kõnealuses katsesüsteemis. Kui ainult üks või kaks neist kriteeriumidest on täidetud, vt punkt 62.

Tingimusel et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui:

a. mitte ühegi uuritud kontsentratsiooni juures ei leitud statistiliselt olulist suurenemist võrreldes samaaegse negatiivse kontrolliga,

b. ei esine kontsentratsioonist sõltuvat suurenemist, kui seda hinnatakse sobiva trendikatsega,

c. kõik tulemused on varasemate katsete negatiivse kontrolli tulemuste jaotusvahemikus konkreetse liigi, vehiikuli, manustamisviisi, koe ja manustamiskordade arvu puhul,

d. on esitatud otsesed või kaudsed tõendid, mis tõendavad sihtkoe kokkupuudet uuritava kemikaaliga või selle toksilisust sihtkoe suhtes.

Uuritav kemikaal loetakse sellisel juhul võimetuks põhjustama DNA-ahelate katkemisi kudedes, mida uuriti kõnealuses katsesüsteemis.

Selgelt positiivset või negatiivset vastust ei ole vaja kinnitada.

Kui vastus ei olnud selgelt negatiivne ega selgelt positiivne (s.t mitte kõik punktides 59 või 60 loetletud kriteeriumid ei olnud täidetud) ning selleks, et aidata kindlaks teha tulemuste bioloogilist olulisust, tuleb andmeid hinnata eksperdihinnanguga ja/või teha täiendavaid uuringuid, kui see on teaduslikult põhjendatud. Kasulik võib olla täiendavate rakkude hindamine (vajaduse korral) või korduskatse tegemine optimeeritud tingimuste kasutamisega (nt doosiintervallid, muud manustamisviisid, muud proovivõtuajad või muud koed).

Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavaid uuringuid teha järeldust positiivse või negatiivse tulemuse kohta; sel juhul loetakse tulemus ebaselgeks.

▼M7

Positiivse või ebaselge tulemuse bioloogilise olulisuse hindamiseks on vaja teavet tsütotoksilisuse kohta sihtkoe suhtes (vt punktid 54–55). Kui positiivseid või ebaselgeid tulemusi täheldatakse üksnes selgete tsütotoksilisuse tõendite esinemise puhul, tuleb uuring lõpetada järeldusega, et teave genotoksilisuse kohta on ebaselge, välja arvatud juhul, kui on olemas piisav teave, mis toetaks lõplikku järeldust. Kui uuringu tulemus on negatiivne, kuid iga uuritud doosi korral avalduvad toksilisuse tunnused, võib olla soovitatav teha täiendav uuring mittetoksilise doosiga.

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, kui on olemas;

— uuritava kemikaali stabiilsus, kasutamise lõpptähtaeg või kordusanalüüsi tegemise tähtaeg, kui see on teada.

Ühe koostisosaga aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILES või InChi kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite keemiline määratlus vajaduse ja praktilise teostatavuse korral jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, komplekssed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid (UVCB) ja segud:

— iseloomustatakse võimaluse korral koostisainete keemiliste nimetuste kaudu (vt eespool), kvantitatiivse sisalduse ja asjakohaste füüsikalis-keemiliste omaduste kaudu.

Lahusti/vehiikul:

— lahusti/vehiikuli valiku põhjendus;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja stabiilsus lahustis/vehiikulis, kui on teada;

— teatava koostisega dooside valmistamine;

— osutatud koostisega doosidega tehtud analüüsid (nt stabiilsus, homogeensus, nominaalsed kontsentratsioonid).

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin ja selle valimise teaduslik ja eetiline põhjendus;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, söötmine, keskkonna rikastamine jne;

— iga looma mass katse alguses ja lõpus, sh kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

— positiivse ja negatiivse (vehiikuli/lahusti) kontrolli andmed;

▼M7

— doosivahemiku määramise uuringu tulemused, kui see tehti;

— doositaseme valimise põhjendus;

— uuritud kemikaali preparaadi valmistamise üksikasjad;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— manustamistee põhjendus;

— süstimiskoht (subkutaanse ja intravenoosse uuringu puhul);

— proovide valmistamise meetodid, kui kasutati, histopatoloogiliste analüüside meetodid, eriti kemikaali puhul, mis põhjustas komeedikatses positiivse tulemuse;

— koe valimise põhjendused;

— meetodid, millega kontrolliti, et uuritav kemikaal jõudis sihtkoesse või üldvereringesse, kui saadi negatiivsed tulemused;

— tegelik doos (mg kehamassi kg kohta päevas), mis arvutatakse sööda/joogivee tarbimise ja selles uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) järgi, kui asjakohane;

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus ja nende valiku põhjendused (nt toksiko-kineetilised andmed, kui kättesaadavad);

— valu leevendamise meetod, analgeesia;

— eutanaasia meetod;

— kudede eraldamise ja säilitamise kord;

— üksikrakkude/-tuumade suspensiooni valmistamise meetodid;

— kõikide reaktiivide allikad ja partiinumbrid (võimaluse korral);

— tsütotoksilisuse hindamise meetodid;

— elektroforeesi tingimused;

— kasutatud värvimismeetodid; ning

— komeetide hindamise ja mõõtmise meetodid.

Tulemused:

— iga looma üldkliiniline vaatlus enne katset ja kogu katse ajal;

— tõendid tsütotoksilisuse kohta, kui selliseid katseid tehti;

▼M7

— rohkem kui üks nädal kestnud uuringu puhul: iga looma kehamass kogu katse ajal, sh iga rühma kohta kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve; sööda tarbimine;

— doosi-toime seos, kui esineb;

— iga koe ja looma kohta, sabas oleva DNA % (või muud valitud näitajad) ja mediaanväärtused iga alusklaasi puhul, keskväärtused iga looma puhul ja rühma keskväärtus;

— paralleelsed ja varasemad negatiivse kontrolli andmed, nende vahemikud, keskväärtused/mediaanväärtused ja standardhälbed iga hinnatud koe puhul;

— paralleelsed ja varasemad positiivse kontrolli andmed;

— muu koe kui maksa puhul doosi-toime vahelise sõltuvuse kõver positiivse kontrolli kemikaaliga. Selle võib võtta pädevuse tõendamise uuringuga kogutud andmetest (vt punktid 16–17) ja sellega koos peab olema esitatud põhjendus, koos viidetega olemasolevale kirjandusele, selle kohta, kas toime ulatus ja tulemuste hajuvus sobivad kontrollide tulemuste puhul kõnealuse koe jaoks;

— kasutatud statistilised analüüsid ja meetodid; ning kriteeriumid, mille alusel uuringutulemus klassifitseeriti positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks;

— „siilide“ sagedus iga rühma ja iga looma kohta.

Tulemuste arutelu

Kokkuvõte

Viited

KIRJANDUS

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), „Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*“, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114–32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), „The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing“, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245–54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), „Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup“, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31–5.

(4) Burlinson, B. (2012), „The *in vitro* and *in vivo* Comet assays“, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143–63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), „Recommendations for design of the rat Comet assay“, *Mutagenesis*,Vol. 23/3, pp. 233–40.

(6) Hartmann, A. *et al*. (2003), „Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay“, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45–51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), „The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review“, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47–63.

(8) Tice, R.R. *et al*. (2000), „Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206–21.

▼M7

(9) Singh, N.P. *et al*. (1988), „A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells“, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184–91.

(10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), „Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies“, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40–69.

(11) OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.

(12) OECD (2014), „Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens“, *Series on Testing and Assessment*, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), „Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet“ assay“, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86–94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), „The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans“, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207–14.

(15) Collins, A.R (2004), „The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations“, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249–61.

(16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), „Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108–20.

(17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), „Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing“, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), „Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation“, *Mutagenesis,* Vol. 25/2, pp. 187–99.

(19) Bowen, D.E. (2011), „Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7–19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), „Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol“, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149–62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), „Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract“, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621–3.

(22) Hartmann, A. (2004), „Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations“, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51–9.

(23) Nesslany, F. (2007), „*In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28–41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), „A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175–8.

▼**M7**

(25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), „Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175–80.

(26) Struwe, M. *et al*. (2008), „Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay“, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240–9.

(27) Wada, K. *et al*. (2012), „A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26–30.

(28) Wang, A. *et al*. (2007), „Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51–9.

(29) Burlinson, B. *et al*. (2007), „*In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31–5.

(30) Jackson, P. *et al*. (2012), „Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring“, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486–500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), „The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database“, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629–799.

(32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), „Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay“, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53–74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), „The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity“, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3–12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), „Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice“, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275–282.

(35) Cordelli, E. *et al*. (2003), „Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation“, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443–451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), „Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167–72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), „Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196–201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), „Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay“, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165–81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), „Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay“, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267–282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), „Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7–16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), „Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup“, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31–5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), „Comet Assay measurements: a perspective“, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53–64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), „The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments“, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689–95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), „Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group“, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109–11.

(45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), „Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial“, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113–23.

(46) Azqueta, A. *et al*. (2011), „Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions“, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41–45.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), „Compilation and use of genetic toxicity historical control data“, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) *Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes* (ETS No. 123)

(50) Käesoleva lisa peatükk B.8. *Subakuutne mürgisus sissehingamisel: 28-päevane uuring*.

(51) Käesoleva lisa peatükk B.29. *Subkrooniline mürgisus sissehingamisel: 90-päevane uuring*.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), „Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells“, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141–45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), „The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells“, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35–41.

(54) OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, *Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment* No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), „Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay“, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50–4.

(56) Hartmann, A. *et al*. (2003), „Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay“, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp. 45–51.

(57) *Atlas of Comet Assay Images*, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), „Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies“, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109–19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), „Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay“, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167–75.

(60) Bright, J. *et al*. (2011), „Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay“, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485–93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), „Statistical issues in the use of the Comet assay“, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171–82.

▼M7

1. liide

MÕISTED

Kemikaal – aine või segu.

Komeet – nukleoidide kuju pärast elektroforeesi, sarnasuse põhjal komeetidega: pea on tuum ja saba koosneb DNAst, mis on migreerunud tuumast välja elektrivälja toimel.

Kriitilise tähtsusega muutuja/näitaja – see on metoodikapõhine muutuja, mille väike muutus võib avaldada suurt mõju katse lõppjäreldusele. Kriitilise tähtsusega muutujad võivad olla koespetsiifilised. Kriitilise tähtsusega muutujaid ei tohiks muuta, eriti ühe katse piires, võtmata arvesse, kuidas nende muutmine mõjutab katses uuritavat reaktsiooni, näiteks positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud reaktsiooni ulatust ja varieeruvust. Katseprotokollis tuleks loetleda kõik kriitilise tähtsusega muutujate muutmised katse käigus või võrreldes labori tavalise katse-eeskirjaga ning esitada iga muutmise põhjendus.

Leeliseline üksikrakkude geelelektroforees – tundlik meetod esmase DNA-kahjustuse määramiseks üksikraku/-rakutuuma tasandil.

Saba intensiivsus või sabas oleva DNA protsent (%) – see kujutab endast komeedi saba suhtelist intensiivsust, võrreldes summaarse intensiivsusega (pea ja saba kokku). See peegeldab DNA-ahela katkete hulka, mis on väljendatud protsendina.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega ained, komplekssed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid.

▼M7

2. liide

MITME FAKTORI MÄÄRAMIST VÕIMALDAV KATSEPLAAN SUGUDEVAHELISTE ERINEVUSTE KINDLAKSTEGEMISEKS *IN VIVO* KOMEEDIKATSES

Mitme faktori määramist võimaldav katseplaan ja selle analüüs

Selle katseplaani korral kasutatakse vähemalt 5 isas- ja 5 emaslooma igal kontsentratsioonitasemel, seega vähemalt 40 looma (20 isas- ja 20 emaslooma, millele lisatakse asjakohased positiivse kontrolli katsed).

Kõnealune katseplaan on üks lihtsamaid mitme faktori analüüsi katseplaane ja see on samaväärne kahefaktorilise dispersioonanalüüsiga, milles peamised faktorid on sugu ja kontsentratsioonitase. Andmete analüüsimiseks võib kasutada paljusid statistikatarkvara standardpakette, nt SPSS, SAS, STATA, Genstat, samuti võib kasutada R-keskkonda.

Analüüsiga jagatakse andmete dispersioon osadeks: sooga seotud dispersiooniks, kontsentratsiooniga seotud dispersiooniks ja dispersiooniks, mis on seotud soo ja kontsentratsiooni interaktsiooniga. Igaühte nendest liikmetest võrreldakse dispersiooni hinnanguga katses kasutatud samasooliste loomade rühmades samal kontsentratsioonil. Aluseks oleva metoodika täielikud üksikasjad on esitatud paljudes standardsetes statistikaõpikutes (vt viited) ja statistikapakettide help-funktsiooni juhendites.

Analüüsis uuritakse edasi interaktsiooniliiget (sugu × kontsentratsion) ANOVA tabelis ([1]). Olulise interaktsiooniliikme puudumise korral annavad sugudevahelised või kontsentratsioonitasemete vahelised kombineeritud väärtused tasemete vahel kehtivad statistilised testid, mis põhinevad ANOVA rühmasisesel koondatud dispersiooni liikmel.

Analüüsi järgmises etapis jaotatakse kontsentratsioonidevahelise dispersiooni hinnang kontrastideks, millega saab testida kemikaali mõju tulemuste lineaarseid kontraste ja ruutkontraste kõigil kontsentratsioonitasemetel. Kui on olemas oluline interaktsioon (sugu × kontsentratsioon), võib ka selle liikme eraldada lineaarse interaktsiooni × sugu kontrastiks ja ruutinteraktsiooni × sugu kontrastiks. Need liikmed kujutavad endast statistilisi teste selle kohta, kas kemikaali mõju on mõlema soo puhul paralleelne või on kemikaalil eri sugudele erinev mõju.

Ühe rühma piires koondatud dispersiooni hinnangut saab kasutada keskväärtuste erinevuse paariviisilisteks testideks. Neid võrdlusi võiks teha kahe soo keskväärtuste vahel ja eri kontsentratsioonitasemete keskväärtuste vahel, näiteks võrrelda eri kontsentratsioonitasemete keskväärtusi negatiivse kontrolli väärtustega. Juhul, kui esineb oluline interaktsioon, võib võrrelda samast soost loomade puhul eri kontsentratsioonidega saadud tulemuste keskväärtusi või eri sugudest loomade puhul sama kontsentratsiooniga saadud tulemuste keskväärtusi.

Viited

Paljudes statistikaõpikutes käsitletakse lihtsast kahe faktori analüüsist kuni katsemetoodika mudelite keerukamate vormideni ulatuvat mitmefaktoriliste mudelite teooriat, katseplaane, metoodikat, analüüsi ja tõlgendamist, mida on kasutatud katsemetoodika kavandamisel. Järgmine loetelu ei ole ammendav. Mõnes raamatus esitatakse võrreldavate katseplaanide praktilised näited, mõnel juhul koos koodiga, kuidas analüüsida tulemusi mitmesuguste tarkvarapakettide abil.

([1]) Statistikud, kes kasutavad modelleerimist, näiteks üldisi lineaarseid mudeleid (General Linear Models, GLM), võivad samale analüüsile läheneda teisel, kuid võrreldaval viisil; seejuures ei tarvitse nad tingimata tuletada traditsioonilist ANOVA tabelit, mis pärineb veel arvutieelsest ajastust, kui statistilisi näitajaid arvutati algoritmiliste lähenemisviiside abil.

▼**M7**

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. ja Hunter, J.S. (1978), *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York; John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. ja Draper, N.R. (1987), *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons.

(3) Doncaster, C.P. ja Davey, A.J.H. (2007), *Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences.* Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990), *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application.* Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997), *Design and Analysis of Experiments.* John Wiley & Sons.

(6) Winer, B.J. (1971), *Statistical Principles in Experimental Design.* McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J ja Hamada, M.S. (2009), *Experiments: Planning, Analysis and Optimization.* John Wiley & Sons.

▼M7

3. liide

KATSEMEETODI PRAEGUSED PIIRANGUD

Praeguse teadmiste seisu juures on *in vivo* komeedikatsega seotud mitmed piirangud. Loodetakse, et need piirangud vähenevad või neid saab kitsamalt määratleda, kui meetodi rakendamisega saadakse rohkem kogemusi selle kohta, kuidas katse võimaldab õiguslikus kontekstis anda vastuseid ohutusega seotud küsimustele.

1. Mõnda tüüpi DNA-kahjustused võivad olla lühiajalised, st need võidakse parandada liiga kiiresti selleks, et neid saaks vaadelda veel 24 tundi või rohkem pärast viimase doosi manustamist. Ei ole kindlaks tehtud lühiajaliste kahjustuste tüüpide loetelu, samuti ei ole selliste kemikaalide loetelu, mis võivad põhjustada selliseid kahjustusi, samuti ei ole teada, millise aja jooksul seda tüüpi kahjustusi saab tuvastada. Optimaalne proovivõtuaeg võib oleneda kemikaalist või kokkupuuteviisist ja proovivõtuajad tuleks määrata kineetilistest andmetest (näiteks aeg T_{max}, millel saavutatakse suurim kontsentratsioon vereplasmas või koes), kui sellised andmed on kättesaadavad. Enamikus käesoleva katsemeetodi aluseks olnud valideerimisuuringutes on kasutatud lahkamisaega 2 või 3 tundi pärast viimase doosi manustamist. Enamikus kirjanduses avaldatud uuringutest on viimane doos manustatud 2–6 tundi enne surmamist. Nende kogemuste põhjal soovitati seepärast katsemeetodis, et kui ei ole andmeid muude aegade kasuks, tuleks viimane doos manustada kindlaksmääratud ajahetkel vahemikus 2–6 tundi enne lahkamist.

2. Ei ole konkreetseid uuringuandmeid selle kohta, kas katse tundlikkus lühiajaliste DNA-kahjustuste kindlakstegemisel sõltub sööda või joogiveega manustamisest, võrreldes manustamisega toitmissondi abil. Kindlaks on tehtud DNA-kahjustused pärast sööda ja joogiveega manustamist, kuid teateid selliste katsete kohta on suhteliselt vähe; palju rohkem on kogemusi toitmissondiga ja intraperitoneaalse manustamise kohta. Seega võib katse tundlikkus olla vähenenud sööda või joogivee kaudu manustatavate kemikaalide puhul, mis tekitavad lühiajalisi kahjustusi.

3. Laboritevahelisi võrdlusuuringuid ei ole tehtud muude kudede kui maksa ja mao puhul, seepärast ei ole koostatud soovitusi, kuidas saavutada tundlikkust ja reprodutseeritavaid tulemusi muude kudede kui maksa puhul, nagu eeldatavaid positiivse ja negatiivse kontrolli vahemiku väärtusi. Ka maksa puhul ei saavutatud kokkulepet, milline peaks olema negatiivse kontrolli väärtuse alampiir.

4. Kuigi on olemas hulk avaldatud artikleid, milles näidatakse, et *in vitro* tsütotoksilisus avaldab segavat toimet, on olemas väga vähe *in vivo* andmeid ja seepärast ei saa soovitada ühtainsat tsütotoksilisuse näitajat. DNA suurenenud migreerumisega seostatakse selliseid histopatoloogilisi muutusi nagu põletik, rakkude infiltratsioon, apoptootilised või nekrootilised muutused, kuid nagu nähtus JaCVAMi valideerimisuuringust (OECD, 2014), ei põhjusta need muutused alati komeedikatse positiivseid tulemusi ja seega ei ole olemas selliste histopatoloogiliste muutuste kindlat loendit, mis oleksid alati seotud DNA migreerumise suurenemisega. Nn siile (või „pilvi“, „kummitusrakke“) on varem välja pakutud tsütotoksilisuse näitajatena, kuid nn siilide tekkimise etioloogia on ebaselge. On andmeid, mis viitavad sellele, et need võivad olla tingitud kemikaaliga seotud tsütotoksilisusest, mehhaanilisest/ensümaatilisest kahjustusest proovi valmistamise ajal (Guerard jt, 2014) ja/või uuritava kemikaali mingist äärmuslikumast genotoksilisest toimest. Teistest andmetest nähtub, et need tulenevad ulatuslikest, kuid võib-olla parandatavatest DNA-kahjustustest (Lorenzo jt, 2013).

▼M7

5. Kudesid või rakkude tuumasid on edukalt külmutatud hilisemaks analüüsiks. Tavaliselt põhjustab see mõõdetava toime vehiikuli ja positiivse kontrolli katses (Recio jt, 2010; Recio jt, 2012; Jackson jt, 2013). Kui seda kasutatakse, peaks labor tõendama kompetentsust külmutamismeetodite suhtes ja kinnitama, et selliste katseloomade sihtkoes, kellele on manustatud vehiikulit, saavutatakse vastuvõetavalt madal sabas oleva DNA protsent ja et võib siiski veel määrata ka positiivseid vastuseid. Kirjanduses on kirjeldatud kudede külmutamise eri meetodeid. Paraku puudub praegu kokkulepe selle kohta, kuidas kudesid kõige paremini külmutada või sulatada ja kuidas hinnata, kas kemikaali toime võimalik muutumine võib mõjutada katse tundlikkust.

6. Üks hiljutine töö näitab, et kriitilise tähtsusega muutujate loetelu eeldatavasti lüheneb ja kriitiliste muutujate parameetreid saab täpsemini määratleda (Guerard jt, 2014).

Viited

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), „Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114–21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), „Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring“, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699–707.

(3) Lorenzo, Y. *et al*. (2013), „The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead“, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427–32.

(4) OECD (2014), „Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens“, *Series on Testing and Assessment*, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), „Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol“, *J. Toxicol. Sci.* 35:149–62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), „Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101–13.

▼**M8**

B.63. **REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURING**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 421 (2016). Kemikaalide uurimist käsitlevaid OECD katsejuhendeid vaadatakse teaduse arengu arvessevõtmiseks korrapäraselt läbi. Algne sõeluuringut käsitlev katsejuhend nr 421 võeti vastu 1995. aastal ühe esialgse reproduktiivtoksilisuse sõeluuringu katse-eeskirja põhjal, mida arutati kahel ekspertide koosolekul, mis toimusid 1990. aastal Londonis (1) ja 1992. aastal Tokyos (2).

2. Käesolevat katsemeetodit on ajakohastamise eesmärgil täiendatud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivate lõppnäitajatega, mis lisati järelmeetmena lähtuvalt prioriteetsest tegevussuunast, mille OECD käivitas 1998. aastal eesmärgiga vaadata läbi olemasolevad ja töötada välja uued katsejuhendid, et võimaldada sõeluuringute tegemist võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide tuvastamiseks ja selliste kemikaalide hindamist (3). Näiteks täiendati 2008. aastal OECD katsejuhendit nr 407 (käesoleva lisa peatükk B.7 „Suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevane uuring närilistel“) parameetritega, mis sobivad uuritavate kemikaalide endokriinse toime tuvastamiseks. Katsejuhendi nr 421 ajakohastamise eesmärk oli lisada sõeluuringut käsitlevasse juhendisse teatavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida saab hinnata juhul, kui kokkupuuteperiood hõlmab mõnda tundlikku arenguperioodi (sünnieelset või varajast sünnijärgset perioodi).

3. Peale selle lisati katsejuhendisse nr 421 täiendavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida sisaldab ka katsejuhend nr 443 (käesoleva lisa peatükk B.56 „Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring“); need lõppnäitajad valiti lähtuvalt ühest teostatavusuuringust, milles käsitletakse asjaomaste lõppnäitajate lisamisega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi, ning võimalikust vajadusest katsemeetodit nende lisamiseks kohandada (4).

4. Käesolev katsemeetod on kavandatud piiratud hulga andmete saamiseks uuritava kemikaali mõju kohta isas- ja emasloomade paljunemisvõimele, näiteks sugunäärmete talitlusele, paaritumiskäitumisele, eostumisele, sügoodi arengule ja sünnitamisele. See ei ole ette nähtud kasutamiseks olemasolevate katsemeetodite B.31, B.34, B35 või B.56 alternatiivina ega nende asendamiseks.

LÄHTEKAALUTLUSED

5. Käesolevat sõeluuringumeetodit võib kasutada paljunemisvõimele ja/või arengule avalduva võimaliku mõju kohta esialgse teabe saamiseks kas kemikaalide toksikoloogiliste omaduste hindamise varajases etapis või probleemsete kemikaalide uurimisel. Seda võib kasutada ka osana esialgsete sõeluuringute seeriast, mille abil hinnatakse olemasolevaid kemikaale, mille kohta on vähe või ei ole üldse toksikoloogilisi andmeid, samuti ulatuslikumate paljunemisvõimet/arengut käsitlevate uuringute jaoks annusevahemiku kindlaksmääramiseks ning muudel asjakohaseks peetavatel juhtudel. Uuringu tegemisel tuleks järgida juhtpõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19, milles käsitletakse ohutuse hindamiseks kasutatavatel katseloomadel avalduvate kliiniliste tunnuste kindlakstegemist, hindamist ja kasutamist humaanse sekkumise vajadusele viitavate näitajatena (5).

▼M8

6. Käesolev katsemeetod ei võimalda saada ammendavat teavet kõikide paljunemisvõime ja arenguga seotud aspektide kohta. Eelkõige lubab see tuvastada sünnieelse kokkupuute tagajärjel sünnijärgselt avalduvaid ilminguid ja sünnijärgsest kokkupuutest tulenevat mõju üksnes piiratud ulatuses. Käesoleva meetodiga ei saa koguda tõendeid, mis lubaksid lõplikult kinnitada mõju puudumist; see on muu hulgas tingitud loomade suhteliselt väikesest arvust annuserühmades, lõppnäitajate selektiivsusest ja uuringu lühikesest kestusest. Täheldatavaid positiivseid tulemusi aga on võimalik muudest reproduktiiv-/arengutoksilisuse uuringutest saadavate andmete puudumisel kasutada esialgseks ohuhindamiseks ning need aitavad teha otsuseid täiendavate uuringute tegemise vajaduse ja selliste uuringute ajastuse kohta.

7. Sisesekretsioonisüsteemiga seotud näitajaid käsitlevaid tulemusi tuleks vaadelda endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku (6) kontekstis. Nimetatud kontseptuaalses raamistikus on OECD täiendatud katsejuhendi nr 421 kohast meetodit käsitatud 4. taseme *in vivo* meetodina, mis võimaldab saada andmeid sisesekretsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajate kaudu tuvastatava kahjuliku mõju kohta. Sisesekretsioonisüsteemist sõltuvat signaali ei pruugita eraldi võetuna siiski pidada piisavaks tõendiks selle kohta, et uuritava kemikaali puhul on tegemist endokriinfunktsiooni kahjustava kemikaaliga.

8. Käesoleva katsemeetodi puhul eeldatakse, et uuritavat kemikaali manustatakse suu kaudu. Muu manustamisviisi kasutamise korral võib olla vaja teha meetodis muudatusi.

9. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

10. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Uuritavat kemikaali manustatakse astmeliselt suurenevates annustes mitme rühma isas- ja emasloomadele. Isasloomade puhul peaks manustamine toimuma vähemalt nelja nädala kestel kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani, sealhulgas surmamiseelsel päeval (see hõlmab vähemalt kahte paaritumiseelset nädalat, paaritumisperioodi ja umbes kahte paaritumisjärgset nädalat). Kuna isasloomadel on paaritumiseelne manustamisperiood piiratud kestusega, ei pruugi viljakus olla eriti tundlik munanditele avalduva mürgisuse näitaja. Seepärast on vaja teha munandite üksikasjalik histoloogiline analüüs. Kahe nädala pikkust paaritumiseelset manustamisperioodi koos järgneva paaritumise/viljakuse jälgimisega ning manustamisperioodi üldkestusega vähemalt neli nädalat, millele järgneb isasloomade sugunäärmete üksikasjalik histopatoloogiline analüüs, peetakse enamiku isasloomal täheldatavate viljakusele ja spermatogeneesile avalduva mõju ilmingute tuvastamiseks piisavaks.

12. Emasloomade puhul peaks manustamine toimuma kogu uuringu kestel. See hõlmab kahte paaritumiseelset nädalat (eesmärk on jälgida vähemalt kahte tervet innatsüklit), eostumisele eelnevat varieeruva pikkusega ajavahemikku, tiinuse kestust ja vähemalt kolmeteistkümne päeva pikkust sünnitusjärgset perioodi, mis kestab kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani ja hõlmab ka surmamiseelset päeva.

13. Kohanemisperioodile ja innatsükli manustamiseelsele hindamisele järgneva uuringu kestus sõltub emasloomade seisundist ning on umbes 63 päeva (vähemalt 14 päeva pikkune paaritumiseelne periood, (kuni) 14 päeva pikkune paaritumisperiood, 22 päeva pikkune tiinusperiood ja 13 päeva pikkune imetamisperiood).

▼M8

14. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi iga päev hoolikalt mürgisusnähtude suhtes. Uuringu kestel surnud või surmatud loomad lahatakse ning uuringu lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

15. Käesolev katsemeetod on kavandatud kasutamiseks rotil. Kui käesolevas katsemeetodis kirjeldatud näitajaid hinnatakse mõne muu liigi närilistel, tuleks seda üksikasjalikult põhjendada. Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemise rahvusvahelises valideerimisprogrammis, mille puhul on lähtutud OECD katsejuhendist nr 407 (see vastab käesoleva lisa peatükile B.7), kasutati ainsa liigina rotte. Ei tohiks kasutada liine, kus sigivus on väike või kus teadaolevalt esineb sageli arenguhäireid. Tuleks kasutada terveid varem paaritamata loomi, keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomi tuleks iseloomustada liigi, liini, soo, kehamassi ja vanuse järgi. Uuringu alguses peaksid kasutatavate loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle 20 % kummastki soost loomade keskmisest kehamassist. Kui uuring viiakse läbi pikaajalise või tervet põlvkonda hõlmava uuringu eeluuringuna, tuleks mõlemas uuringus soovitatavalt kasutada samast liinist ja sama päritolu loomi.

Pidamis- ja söötmistingimused

16. Kõik katsetoimingud peaksid vastama kohalikele laboriloomade hooldamise normidele. Katseloomade ruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Ehkki suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, on sobivaim vahemik 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärast laborisööta ja piiramatus koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil.

17. Loomade pidamisel tuleks kasutada väikesi samasooliste isendite rühmi; loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud. Rühmas pidamisel ei tohiks puuris olla rohkem kui viis looma. Paaritamine peaks toimuma selleks sobivas puuris. Tiined emasloomad tuleks paigutada igaüks eraldi puuri, kus on olemas pesamaterjal. Imetavad emasloomad paigutatakse igaüks eraldi puuri koos järglaskonnaga.

18. Sööta tuleks korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes. Asjaomase sööda proov tuleks kuni katseprotokolli lõpliku valmimiseni alles hoida.

Loomade ettevalmistamine

19. Terved noored täiskasvanud loomad jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Loomad identitakse üheselt ja neil lastakse enne uuringu algust puuris vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda.

Annuste ettevalmistamine

20. Uuritavat kemikaali on soovitatav manustada suu kaudu, välja arvatud juhul, kui mõnda muud manustamisviisi peetakse sobivamaks. Uuritava kemikaali suukaudseks manustamiseks kasutatakse tavaliselt toitmissondi; selle asemel võib siiski kasutada ka sööda või joogiveega manustamist.

▼M8

21. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda vesilahuse või veepõhise suspensiooni ja seejärel õlilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ning pärast seda lahustamist mõnes muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul peaksid olema teada selle mürgisusnäitajad. Tuleks teha kindlaks uuritava kemikaali püsivus ja homogeensus kandeaines.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

22. Soovitatavalt peaks igas rühmas olema alguses vähemalt 10 isaslooma ja 12–13 emaslooma. Emasloomi hinnatakse kokkupuute eel innatsükli alusel ja loomad, kelle innatsükkel erineb tavapärasest 4–5 päeva pikkusest tsüklist, jäetakse uuringust välja; seepärast on soovitatav kasutada suuremat arvu emasloomi, et igas rühmas oleks lõpuks 10 emaslooma. Eeldatavalt tiinestub igas rühmas vähemalt 8 emaslooma – seda peetakse tavapäraselt minimaalseks vastuvõetavaks tiinestumismääraks –, välja arvatud juhul, kui ilmneb märkimisväärne mürgine mõju. Eesmärk on saada piisav arv tiineid emasloomi, et oleks võimalik usaldusväärselt hinnata uuritava kemikaali võimet mõjutada viljakust, tiinust, ema- ja imetamiskäitumist ning F_1-põlvkonna järglaste kasvu ja arengut eostamisest kuni kolmeteistkümnenda sünnijärgse päevani.

Annused

23. Üldjuhul tuleks kasutada vähemalt kolme katserühma ja ühte kontrollrühma. Annuste valimisel võib lähtuda ägeda mürgisuse hindamise katsetega saadud andmetest või korduvannustamisel põhinevate uuringute tulemustest. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda täpselt samal viisil kui katserühma loomi; ainus erinevus seisneb uuritava kemikaali manustamata jätmises. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleks võrdlusrühma loomadele manustada kandeainet suurimas kasutatavas koguses.

24. Annuste valimisel tuleks võtta arvesse kõiki kättesaadavaid mürgisusandmeid ja (toksiko)kineetilisi andmeid. Samuti tuleks arvesse võtta, et tiinete ja mittetiinete loomade tundlikkus võib olla erinev. Suurim annus tuleks valida nii, et kemikaal avaldaks mürgist mõju, kuid ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Seejärel tuleks valida rida järk-järgult vähenevaid annuseid, mis võimaldaksid tõendada mõju sõltuvust annusest ja teha väikseima annuse põhjal kindlaks täheldatava kahjuliku toime puudumise annuse (NOAEL). Sageli on optimaalne vähenevate annuste vaheline erinevus kahe- kuni neljakordne ning üksteisest väga palju (näiteks üle 10 korra) erinevate annuste kasutamise asemel on tihti soovitatav lisada neljas katserühm.

25. Kui täheldatakse üldist mürgisust (nt kehamassi vähenemine, mõju maksale, südamele, kopsudele või neerudele jne) või muid muutusi, mis ei pruugi olla tingitud mürgisusest (nt väiksem söödatarbimine, maksa suurenemine), tuleks täheldatud mõju sisesekretsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajatele tõlgendada ettevaatusega.

Piirsisalduskatse

26. Kui käesoleva meetodi kohaselt läbi viidud suukaudse manustamise uuringus, milles kasutatakse ainsa annusena annust vähemalt 1 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas või sööda või joogiveega manustamise korral sellega samaväärset protsentuaalset sisaldust söödas või joogivees, ei täheldata mürgist mõju ja kui mürgisus ei ole uuritava kemikaaliga struktuurilt sarnaste ainetega saadud andmete põhjal ootuspärane, ei pruugita pidada mitme eri annusega täismahus uuringu tegemist vajalikuks. Piirsisalduskatse tulemused on kohaldatavad, kui inimese kokkupuutega seotud andmed ei viita vajadusele kasutada suukaudsel manustamisel suuremat annusemäära. Muu manustamisviisi korral, näiteks sissehingamise teel või naha kaudu manustamisel võib uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest tulenevalt olla tihti vaja kasutada suurimat saavutatavat kontsentratsiooni.

▼M8

Annuste manustamine

27. Uuritavat kemikaali manustatakse loomadele seitsmel päeval nädalas. Kui manustamiseks kasutatakse toitmissondi, tuleks kemikaali loomadele manustada ühe annusena maosondi või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Suurim korraga manustatav vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. See kogus ei tohiks olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Katses kasutatava vedelikukoguse varieeruvuse minimeerimiseks tuleks reguleerida uuritava kemikaali kontsentratsiooni nii, et lahuse maht oleks kõikide annuste puhul ühesugune; see ei ole nõutav ärritava või söövitava uuritava kemikaali puhul, mille mõju kontsentratsiooni suurenedes tavaliselt tugevneb.

28. Sööda või joogiveega manustatava uuritava kemikaali puhul on oluline tagada, et seda kasutatakse koguses, mis ei muuda tavapärast toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas muutumatut kontsentratsiooni söödas (ppm) või looma kehamassi suhtes muutumatut annusemäära; tuleks täpsustada, kumba võimalust kasutatakse. Toitmissondi kaudu manustatava uuritava kemikaali puhul peaks manustamine toimuma igal päeval sarnasel kellaajal ning annusemäära tuleks vähemalt kord nädalas kohandada, et see püsiks looma kehamassi suhtes muutumatuna.

Katse ajakava

29. Annuste manustamist tuleks kummagi soo puhul alustada vähemalt kaks nädalat enne paaritamist pärast seda, kui loomadel on lastud vähemalt viis päeva kohaneda ja emasloomi on hinnatud lähtuvalt innatsükli tavapärasest kestusest (töötlemiseelse kahe nädala pikkuse perioodi vältel). Uuringu ajakava peaks olema selline, et innatsükli hindamist alustatakse varsti pärast seda, kui loomad on saanud täielikult suguküpseks. See aeg võib olla eri rotiliinidel ja eri laborites veidi erinev: näiteks Sprague Dawley rottidel saabub suguküpsus 10 nädala vanuses ja Wistari rottidel umbes 12 nädala vanuses. Järglastega emasloomad tuleks surmata 13. sünnitusjärgsel päeval või veidi hiljem. Sünnitamispäeva (päev, mil sünnitus lõpeb) loetakse sünnitusjärgseks 0-päevaks. Emasloomad, kellel ei täheldata paaritumise ilminguid, surmatakse 24–26 päeva pärast paaritumisperioodi viimast päeva. Paaritumisperioodi vältel jätkatakse kummastki soost loomadele kemikaali manustamist. Isasloomadele manustamist tuleks paaritumisperioodi järgselt jätkata vähemalt seni, kuni manustamisperioodi algusest on möödunud kokku minimaalselt 28 päeva. Seejärel loomad surmatakse või teise võimalusena jätkatakse neile kemikaali manustamist, et viia võimaluse korral läbi teine paaritamine, kui seda peetakse asjakohaseks.

30. Tiinestunud emasloomade puhul tuleks igapäevast manustamist jätkata kogu tiinuse vältel ning vähemalt kuni 13. sünnitusjärgse päevani, sealhulgas nimetatud päeval, või kuni surmamiseelse päevani. Uuringute puhul, kus uuritavat kemikaali manustatakse sissehingamise teel või naha kaudu, tuleks manustamist jätkata vähemalt kuni 19. tiinuspäevani, sealhulgas nimetatud päeval, ning taasalustada seda võimalikult varakult ja mitte hiljem kui 4. sünnitusjärgsel päeval.

31. Katse skemaatiline ajakava on esitatud 2. liites.

Paaritamine

32. Käesoleva meetodi kohases uuringus tuleks üldjuhul kasutada paaritamisel suhet 1: 1 (üks isasloom ühe emaslooma kohta). Erandi võib teha juhul, kui isasloomad juhtuvad surema. Emaslooma tuleks hoida sama isaslooma juures seni, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid või on möödunud kaks nädalat. Emasloomi tuleks igal hommikul uurida sperma või tupekorgi esinemise suhtes. Tiinuse 0-päevaks loetakse päeva, mil paaritumise toimumine leiab kinnitust (leitakse tupekork või spermat). Kui paaritamine ebaõnnestub, võib kaaluda emaslooma uuesti paaritamist sama rühma viljakaks osutunud isasloomaga.

▼M8

Pesakonna suurus

33. Neljandal sünnijärgsel päeval võib iga pesakonna suurust korrigeerida; selleks kõrvaldatakse juhuvaliku alusel üleliigsed järglased nii, et pesakonda jääks sõltuvalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest võimalikult täpselt neli või viis järglast kummagi soo kohta. Üleliigsetest järglastest kahelt tuleks võtta vereproov, moodustada nendest koondproov ja kasutada seda seerumi T_4-sisalduse määramiseks. Järglaste selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi või anogenitaalse vahemaa (AGD) alusel, ei ole sobiv. Kui emaste või isaste järglaste arv ei võimalda jätta pesakonda nelja või viit järglast kummastki soost, on vastuvõetav ka osaline korrigeerimine (nt kuus isast ja neli emast). Kui pesakond jääks kõrvaldamise tagajärjel väiksemaks kui kõrvaldamisega saavutatav soovitud sihtarv (8 või 10 järglast pesakonna kohta), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui kõrvaldamisega saavutatava soovitud sihtarvuga võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T_4-sisalduse hindamiseks.

34. Kui pesakonna suurust ei korrigeerita, surmatakse 4. sünnijärgsel päeval igast pesakonnast kaks järglast ning neilt võetakse vereproov seerumi kilpnäärmehormoonisisalduse mõõtmiseks. Võimaluse korral peaksid kõnealused kaks järglast igast pesakonnast olema emased, et võimaldada isaste järglaste kasutamist nisade esinemise hindamiseks; see soovitus ei kehti juhul, kui kõnealuse kahe järglase eemaldamisel ei jääks pesakonda ühtki emast, keda uuringu lõpus hinnata. Kui pesakonda jääks kõrvaldamise tagajärjel vähem kui 8 või 10 järglast (olenevalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui pesakonna tavapärase suurusega võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T_4-sisalduse hindamiseks.

Elusloomadel tehtavad vaatlused

Kliinilised vaatlused

35. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks kogu uuringuperioodi vältel teha vähemalt kord päevas ja mürgisusnähtude ilmnemisel sagedamini. Vaatlusi tuleks soovitatavalt teha igal päeval samal ajal või samadel aegadel; seejuures tuleks võtta arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju maksimaalse avaldumise aega. Tuleks registreerida asjakohased muutused käitumises, raskele või kauakestnud sünnitusele viitavad ilmingud ja kõik mürgisusnähud, sealhulgas suremus. Registreeritavad andmed peaksid hõlmama mürgisusnähtude esinemise algusaega, ulatust ja kestust.

Kehamass ja sööda/vee tarbimine

36. Isas- ja emasloomi tuleks kaaluda esimesel manustamispäeval ning seejärel vähemalt kord nädalas, samuti surmamise ajal. Tiinuse ajal tuleks emasloomi kaaluda tiinuse 0-päeval, 7., 14. ja 20. päeval, samuti tuleks neid kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Nimetatud vaatluste tulemused tuleks esitada eraldi iga täiskasvanud looma kohta.

37. Paaritumiseelsel perioodil ning tiinuse ja imetamise ajal tuleks söödatarbimist mõõta vähemalt kord nädalas. Paaritumisperioodil ei ole söödatarbimise mõõtmine kohustuslik. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks eelnimetatud perioodidel mõõta ka veetarbimist.

Innatsükkel

38. Enne töötlemise alustamist tuleks jälgida innatsüklit ning valida selle alusel uuringusse emasloomad, kelle tsükkel on korrapärane (vt punkt 22). Tupeäigeid tuleks igapäevaselt hinnata ka alates töötlemisperioodi algusest kuni paaritumise ilmingute tuvastamiseni. Kui on kahtlus, et innatsükkel võib pärast manustamise alustamist ägeda stressi mõjul muutuda, võib katseloomi

▼M8

laboris 2 nädala vältel uuritava kemikaaliga töödelda ning seejärel koguda paaritumiseelsel perioodil innatsükli jälgimiseks vähemalt kahe nädala jooksul iga päev tupeäigeid ja jätkata jälgimist ka paaritumisperioodil, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid. Tupe-/emakakaelarakkude võtmisel tuleks olla ettevaatlik, et mitte kahjustada limaskesta, kuna see võib põhjustada pseudotiinuse teket (7, 8).

Järglastega seotud näitajad

39. Tiinuse kestus tuleks registreerida; selle arvutamisel lähtutakse tiinuse 0-päevast. Iga pesakonda tuleks pärast sündi võimalikult varakult hinnata, et teha kindlaks järglaste arv ja sugu, surnultsünnid, elussünnid, kängunud järglaste (vastavatest kontrolljärglastest palju väiksemate järglaste) arv ja silmaga nähtavate kõrvalekallete esinemine.

40. Elus järglased tuleks loendada ja määrata nende sugu ning pesakonda tuleks kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Peale punktis 35 kirjeldatud vaatluste tulemuste tuleks registreerida ka kõik järglaste ebatavalise käitumise ilmingud.

41. Kõikidel järglastel tuleks ajavahemikul sünnijärgsest 0-päevast kuni 4. sünnijärgse päevani mõõta ühel ja samal päeval AGD. Järglaste kehamassi andmed tuleks koguda AGD mõõtmise päeval ja AGD tuleks normaliseerida järglase suurust kajastava näitaja, soovitatavalt kehamassi kuupjuure suhtes (9). Isastel järglastel tuleks 12. või 13. sünnijärgsel päeval loendada nisade/areoolide arv, nagu on soovitatud OECD katsejuhendis nr 151 (10).

Kliiniline biokeemiline analüüs

42. Vereproovid võetakse kindlaksmääratud kohast järgmise kava alusel:

— igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt 4. sünnijärgsel päeval, kui järglaste arv seda võimaldab (vt punktid 33–34),

— kõikidelt järglastega emasloomadelt ja igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt surmamise ajal 13. päeval ning

— kõikidelt täiskasvanud isasloomadelt surmamise ajal.

Kõiki vereproove säilitatakse sobivates tingimustes. Järglastelt 13. päeval võetud vereproovides ja täiskasvanud isasloomade vereproovides analüüsitakse kilpnäärmehormoonide (T_4) sisaldust seerumis. Kui see on asjakohane, hinnatakse T_4 sisaldust ka järglastega emasloomade vereproovides ja järglastelt 4. päeval võetud vereproovides. Kui see on asjakohane, võib soovi korral mõõta ka muude hormoonide sisaldust. Järglaste vere võib kilpnäärmehormoonide analüüsimiseks pesakonnakaupa kokku koondada. Soovitatavalt tuleks mõõta kilpnäärmehormoonide (T_4 ja TSH) üldsisaldust.

43. Hormoonide määramisel võivad varieeruvust ja absoluutset kontsentratsiooni mõjutada järgmised tegurid:

— surmamise aeg tulenevalt asjaolust, et hormoonide kontsentratsioon ööpäeva jooksul muutub;

— surmamisviis – tuleks hoiduda tekitamast loomadele tarbetut stressi, mis võib mõjutada hormoonide kontsentratsiooni;

— hormoonide määramise komplektid, milles kasutatavad standardkõverad võivad olla erinevad.

▼M8

44. Konkreetselt hormoonide määramiseks ette nähtud eri plasmaproovid tuleks koguda umbes samal kellaajal. Hormoonisisalduse analüüsimisel saadavad arvväärtused on müügilolevate eri katsekomplektide puhul erinevad.

Patoloogiline analüüs

Täielik lahkamine

45. Surmatud või uuringu vältel surnud täiskasvanud loomi tuleks kohe pärast surma makroskoopiliselt uurida mis tahes kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Tuleks registreerida pesastumiskohtade arv. Lahkamispäeva hommikul tuleks analüüsida tupeäiet, et teha kindlaks innatsükli etapp ja võimaldada korreleerimist munasarja histopatoloogilise analüüsi tulemustega.

46. Kõikide täiskasvanud isasloomade munandid ja munandimanused ning eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega tuleks vajaduse korral vabastada nende külge jäänud kudedest ja kuivamise ärahoidmiseks tuleks elundite märgmass määrata võimalikult kiiresti pärast nende väljalõikamist. Peale selle võib soovi korral kaaluda isasloomade puhul sellised elundid nagu pärakutõsturlihase ja sibulakäsnkeha-lihase kompleks, Cowperi näärmed ja sugutilukk ning emasloomade puhul munasarjade paar (märgmass) ja emakas (koos emakakaelaga); kui seda tehakse, peaks kaalumine toimuma võimalikult kiiresti pärast elundite väljalõikamist.

47. Surnud järglasi ja 13. sünnijärgsel päeval või varsti pärast seda surmatud järglasi tuleks miinimumnõudena väliselt hoolikalt uurida silmaga nähtavate kõrvalekallete suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata välistele suguelunditele, mida tuleks uurida arenguhäirete ilmingute suhtes. Kolmeteistkümnendal sünnijärgsel päeval tuleks võtta säilitamiseks kilpnääre iga pesakonna ühelt isaselt ja ühelt emaselt järglaselt.

48. Samuti tuleks säilitada kõikide täiskasvanud loomade munasarjad, munandid, suguelundid (emakas ja emakakael, munandimanused, eesnääre, seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega), kilpnääre ja kõik makroskoopiliste kahjustustega elundid. Munandite ja munandimanuste tavapärasel analüüsil ei soovitata kasutada fikseerimist formaliiniga. Nende kudede puhul võib vastuvõetava meetodina kasutada Bouini fikseerimislahust või muudetud Davidsoni lahust (11). Fikseerimislahuse kiire sissetungimise võimaldamiseks võib elundi kummaski otsas valkjaskesta ettevaatlikult väikese sügavuseni nõelaga läbi torgata.

Histopatoloogiline analüüs

49. Suurima annusega töödeldud rühma ja kontrollrühma loomade puhul tuleks viia läbi munasarjade, munandite ja munandimanuste üksikasjalik histoloogiline uuring (seejuures tuleks pöörata erilist tähelepanu spermatogeneesi etappidele ja munandite interstitsiaalrakustruktuuri histopatoloogilisele analüüsile). Vajaduse korral võib uurida ka teisi säilitatud elundeid, sealhulgas järglastelt ja täiskasvanud loomadelt saadud kilpnääret. Kilpnäärme massi võib määrata pärast fikseerimist. Liigsed koed tuleks samuti eemaldada väga ettevaatlikult alles pärast fikseerimist, et kudesid mitte kahjustada. Koekahjustus võib mõjutada histopatoloogilise analüüsi tulemusi. Kui suurima annusega töödeldud rühmas täheldatakse muutusi, peaks analüüs hõlmama ka teiste annuserühmade loomi. Täiendav üksikasjalik teave sisesekretsioonisüsteemi kudede väljalõikamise, fikseerimise, neist lõikude tegemise ja nende histopatoloogilise analüüsi kohta on esitatud histopatoloogilise analüüsi juhendis (11).

▼M8

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

50. Andmed tuleks esitada iga looma kohta eraldi. Peale selle tuleks esitada kõik andmed kokkuvõtliku tabeli kujul, kus on iga katserühma puhul toodud ära loomade arv katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel surmatud loomade arv ning surma või humaanse surmamise aeg, viljakate loomade arv, tiinete emasloomade arv, mürgisusnähtudega loomade arv, mürgisusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise mõju ilmnemisaeg, kestus ja tugevus, histopatoloogiliste muutuste liik ja kõik asjakohased andmed pesakonna kohta. Paljunemisele/arengule avalduva mõju hindamiseks väga kasulikuks osutunud aruandevorm kokkuvõtliku tabeli kujul on esitatud 3. liites.

51. Uuringu piiratud ulatusest tulenevalt on tulemuste olulisuse tuvastamiseks tehtava statistilise analüüsi väärtus paljude lõppnäitajate, eelkõige paljunemisega seotud lõppnäitajate puhul piiratud. Statistilise analüüsi kasutamisel tuleks valida meetod, mis on uuritava muutuja väärtuste jaotuse analüüsimiseks sobiv, ning see valik tuleks teha enne uuringu alustamist. AGD ja nisade esinemise statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonnas ilmnevat mõju. Vajaduse korral käsitatakse analüüsiüksusena pesakonda. Järglaste kehamassi statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonna suurust. Ühtlasi võib rühmade väiksusest tulenevalt olla kasulik kasutada uuringutulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks varasemaid kontrollidega saadud andmeid (nt pesakonna suuruse kohta), kui need on olemas.

Tulemuste hindamine

52. Käesoleva meetodi kohase mürgisusuuringu tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt täheldatud mõjust, lahkamistulemustest ja mikroskoopilistest leidudest. Hindamine hõlmab seose kindlakstegemist uuritava kemikaali annuse ja kõrvalekallete – sealhulgas silmaga nähtavate kahjustuste, tuvastatud sihtelunditele avalduva mõju, viljatuse, kliiniliste kõrvalekallete, paljunemisvõimele ja pesakonnale avalduva mõju, kehamassi muutuste, suremusele avalduva mõju ja mis tahes muu mürgise mõju – esinemise või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel.

53. Isasloomade töötlemise lühiajalisuse tõttu tuleks isasloomade paljunemisele avalduva mõju hindamisel vaadelda munandite ja munandimanuste histopatoloogilise analüüsi tulemusi koos viljakusandmetega. Ühtlasi võib uuringutulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks olla kasulik kasutada kontrollidega saadud varasemaid paljunemist/arengut käsitlevaid andmeid (nt pesakonna suuruse, AGD, nisade esinemise või seerumi T_4-sisalduse kohta), kui need on olemas.

54. Kvaliteedikontrolli eesmärgil on soovitatav koguda kontrolle käsitlevaid varasemaid andmeid ja arvutada arvandmete jaoks variatsioonikordajad, eriti näitajate puhul, mis on seotud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemisega. Neid andmeid võib kasutada võrdlusalusena käsiloleva uuringu tulemuste hindamiseks.

Katseprotokoll

55. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;

— uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

▼**M8**

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valimise põhjendus, kui kandeaine ei ole vesi.

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;

— iga looma kehamass katse alguses;

— liigi valimise põhjendus, kui katseloom ei ole rott.

Katsetingimused:

— annuste valimise põhjendus;

— üksikasjad uuritava kemikaali valmistise / söödavalmistise, saavutatud kontsentratsioonide ning valmistise püsivuse ja homogeensuse kohta;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— vajaduse korral andmed söödas/joogivees sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendamiseks tegelikuks annuseks (mg kehamassi kilogrammi kohta päevas);

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— järglaste surmamise korral üksikasjalik kirjeldus surmatavate järglaste juhusliku valimise korra kohta.

Tulemused:

— kehamass / kehamassi muutused;

— söödatarbimine ja veetarbimise andmed, kui need on olemas;

— mürgise mõju andmed kummagi soo ja iga annusemäära kohta, sealhulgas viljakusele ja tiinusele avalduva mõju ning mis tahes muude mürgisusnähtude kohta;

— tiinuse kestus;

— mürgisus või muu mõju paljunemisele, järglastele, sünnijärgsele kasvule jne;

— kliiniliste ilmingute laad, raskusaste ja kestus (nähtude pöörduvus või pöördumatus);

— normaalse või ebanormaalse innatsükliga täiskasvanud emasloomade arv ja tsükli kestus;

— elussündide arv ja pesastumisjärgne kadu;

— järglaste kehamassi andmed;

— iga järglase AGD (ja kehamass AGD mõõtmise päeval);

▼M8

— nisade esinemine isastel järglastel;

— kilpnäärmehormoonide sisaldus järglastelt 13. päeval võetud proovides ja täiskasvanud isasloomade proovides (ning järglastega emasloomade proovides ja järglastelt 4. päeval võetud proovides, kui seda on mõõdetud);

— silmaga nähtavate kõrvalekalletega järglaste arv, väliste suguelundite makroskoopilise hindamise tulemused, kängunud järglaste arv;

— katse vältel suremise aeg või teave selle kohta, et loomad olid kuni surmamiseni elus;

— pesastunud embrüote arv, pesakonna suurus ja pesakonna kaal mõõtmishetkel;

— andmed järglastega loomade kehamassi kohta surmamise hetkel ning selliste loomade elundite massi kohta;

— lahkamistulemused;

— histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— andmed absorbeerumise kohta (kui on olemas);

— vajaduse korral tulemuste statistilise analüüsi andmed.

Tulemuste arutelu

Järeldused

Tulemuste tõlgendamine

56. Kirjeldatud uuring võimaldab hinnata annuste korduval manustamisel täheldatavat paljunemisele/arengule avalduvat mürgist mõju (vt punktid 5 ja 6). Saadud tulemused võivad viidata vajadusele teha täiendavaid uuringuid ja hõlbustavad järgnevate uuringute kavandamist. Paljunemise ja arenguga seotud tulemuste hõlpsamaks tõlgendamiseks tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga nr 43 (12). Käesoleva katsemeetodi puhul võib olla kasu närilistega tehtavate sisesekretsioonisüsteemi ja paljunemisega seotud katsete tulemuste histoloogilist hindamist käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 106 (11) esitatud teabest (sisesekretsiooni)elundite ja tupeäiete ettevalmistamise ja hindamise kohta.

KIRJANDUS

(1) OECD (1990). Kemikaalide töörühma ja halduskomitee 14. ühiskoosoleku koosolekudokument nr 1. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.

(2) OECD (1992). Ajutise eksperdirühma esimehe aruanne reproduktiivtoksilisust käsitlevate sõeluuringumeetodite alase koosoleku kohta. Tokyo, 27.–29. oktoober 1992. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.

(3) OECD (1998). Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise (EDTA) OECD rakkerühma esimese koosoleku aruanne. 10.–11. märts 1998. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 217. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(5) 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M8**

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(7) Goldman, J. M., Murr, A. S., ja Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res. B* 80(2): 84–97.

(8) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons. Väljaandes: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization. Auston, C. R., ja Short, R. V. (toim.), Cambridge, New York.

(9) Gallavan, R. H. Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., ja Reynolds, V. L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights. *Reprod. Toxicol.* 13: 383–390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 151. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 106. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 43. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M8**

1. liide

MÕISTED (VT KA OECD JUHENDDOKUMENT NR 150 (6))

Androgeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik androgeen (nt testosteroon).

Annus – manustatav uuritava kemikaali kogus. Annust väljendatakse uuritava kemikaali kogusena massiühikutes katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas) või kemikaali püsiva kontsentratsioonina söödas.

Annustamine – üldmõiste, mis hõlmab annust, selle manustamise sagedust ja annustamise kestust.

Antiandrogeensus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku androgeeni (nt testosterooni) toimet.

Antitüreoidne aktiivsus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku kilpnäärmehormooni (nt $T_{3)}$ toimet.

Antiöstrogeensus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku östrogeeni (nt 17β-östradiooli) toimet.

Arengutoksilisus – reproduktiivtoksilisuse ilming, mis avaldub järglaste sünnieelse, perinataalse või sünnijärgse struktuuri- või funktsioonihäirena.

Emale avalduv mürgisus – tiinele emasloomale avalduv kahjulik mõju, mis on spetsiifiline (otsene mõju) või mittespetsiifiline (kaudne mõju).

Ilmne mürgisus – üldmõiste, mille abil kirjeldatakse uuritava kemikaali manustamise järel täheldatavaid selgeid mürgisusnähte. Kõnealused nähud peaksid olema ohu hindamiseks piisavad ja sellised, et manustatava annuse suurendamisega kaasnevad eeldatavalt tõsised mürgisusnähud ja tõenäoliselt ka surm.

Kemikaal – aine või segu.

NOAEL – lühend, millega tähistatakse annusemäära, mille juures ei täheldata kahjulikku toimet. Tegemist on suurima annusega, mis ei põhjusta manustamisest tingitud kahjulikke ilminguid.

Reproduktiivtoksilisus – kahjulik mõju järglastele ja/või isas- või emasloomade paljunemisfunktsioonile või paljunemisvõimele.

Türeoidne aktiivsus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik kilpnäärmehormoon (nt T_3).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideerimine – teaduslik protsess, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi rakendamisega seotud nõudeid ja piiranguid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja sobivust konkreetsel eesmärgil kasutamiseks.

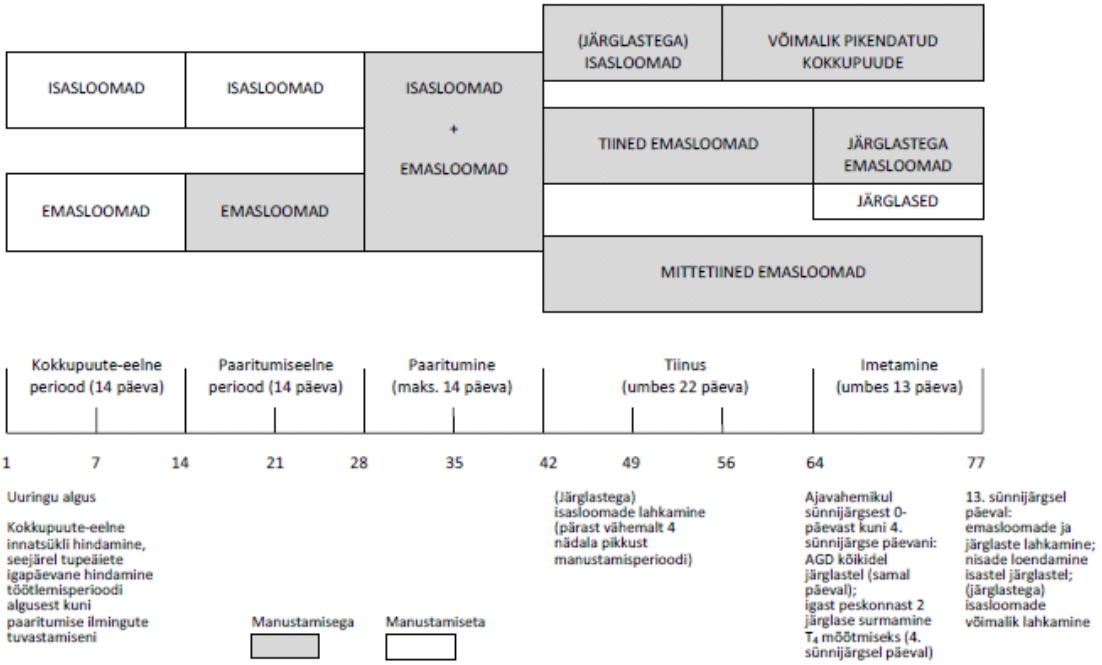
Viljakuse vähenemine – isas- või emaslooma paljunemisfunktsiooni häire või paljunemisvõime langus.

Östrogeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik östrogeen (nt 17β-östradiool).

▼**M8**

2. liide

UURINGU MAKSIMUMKESTUSELE VASTAV TÄISPIKAL 14-PÄEVASEL PAARITUMISPERIOODIL PÕHINEV KATSE SKEMAATILINE AJAKAVA



▼**M8**

3. liide

TABELI KUJUL KOKKUVÕTLIK ARUANNE PALJUNEMISELE/ARENGULE AVALDUVA MÕJU KOHTA

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
Annus (ühik)	0 (kontroll)	…	…	…	…
Paaride arv katse alguses (*N*)					
Innatsükkel (vähemalt keskmine pikkus ja ebaregulaarsete tsüklite esinemissagedus)					
Emasloomad, kellel täheldatakse paaritumise ilminguid (*N*)					
Tiinestunud emasloomad (*N*)					
Eostunud 1.–5. päeval (*N*)					
Eostunud 6.–… ([1]) päeval (*N*)					
Tiinuse kestus ≤ 21 päeva (*N*)					
Tiinuse kestus 22 päeva (*N*)					
Tiinuse kestus ≥ 23 päeva (*N*)					
Elusalt sündinud järglastega emasloomad (*N*)					
4. sünnijärgse päevani elus püsinud järglastega emasloomad (*N*)					
Pesastunud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta (keskmine)					
Elussündide arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
4. päevani elus püsinud järglaste arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) sünnihetkel (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) 4. päeval (keskmine)					
Pesakonna kaal sünnihetkel (keskmine)					
Pesakonna kaal 4. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass sünnihetkel (keskmine)					
Järglaste kehamass AGD mõõtmise hetkel (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine)					

▼M8

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
Annus (ühik)	0 (kontroll)	…	…	…	…
Järglaste AGD samal sünnijärgsel päeval ajavahemikul sündimispäevast kuni 4. päevani (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine; märkida sünnijärgne mõõtmispäev)					
Järglaste kehamass 4. päeval (keskmine)					
Nisade esinemine isastel järglastel 13. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass 13. päeval (keskmine)					
KÕRVALEKALLETEGA JÄRGLASED					
Järglastega emasloomad, kellel on 0 kõrvalekalletega järglast					
Järglastega emasloomad, kellel on 1 kõrvalekalletega järglane					
Järglastega emasloomad, kellel on ≥ 2 kõrvalekalletega järglast					
JÄRGLASTE KADU					
Sünnieelne/pesastumisjärgne (pesastunud embrüote arvu ja elussündide arvu vahe)					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
≥ 3 järglast kaotanud emasloomad					
Sünnijärgne (elussündide arvu ja 13. sünnijärgse päevani elus püsinud järglaste arvu vahe)					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
≥ 3 järglast kaotanud emasloomad					

([1]) Paaritumisperioodi viimane päev.

▼M8

B.64. REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURINGUT HÕLMAV KORDUVANNUSTAMISEL PÕHINEV MÜRGISUSUURING

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 422 (2016). Kemikaalide uurimist käsitlevaid OECD katsejuhendeid vaadatakse teaduse arengu arvessevõtmiseks korrapäraselt läbi. Algne sõeluuringut käsitlev katsejuhend nr 422 võeti vastu 1996. aastal ühe reproduktiiv-/arengutoksilisuse hindamist hõlmava korduvannustamisel põhineva sõeluuringu katseeeskirja põhjal, mida arutati kahel ekspertide koosolekul, mis toimusid 1990. aastal Londonis (1) ja 1992. aastal Tokyos (2).

2. Käesoleva katsemeetodi puhul on reproduktiiv-/arengutoksilisuse sõeluuring, mis põhineb liikmesriikides suures mahus toodetavate olemasolevate kemikaalide hindamiseks kasutatud algse meetodiga omandatud ja positiivseid kontrollaineid hõlmavatest ettevalmistavatest katsetest saadud kogemustel (3, 4), ühendatud korduvannustamisel avalduva mürgisuse uuringuga, mis on kooskõlas OECD katsejuhendiga nr 407 (sellele vastab käesoleva lisa peatükk B.7 „Suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevane uuring närilistel“).

3. Käesolevat katsemeetodit on ajakohastamise eesmärgil täiendatud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivate lõppnäitajatega, mis lisati järelmeetmena lähtuvalt prioriteetsest tegevussuunast, mille OECD käivitas 1998. aastal eesmärgiga vaadata läbi olemasolevad ja töötada välja uued katsejuhendid, et võimaldada sõeluuringute tegemist võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide tuvastamiseks ja selliste kemikaalide hindamist (5). Selles kontekstis täiendati 2008. aastal katsejuhendit nr 407 (sellele vastab käesoleva lisa peatükk B.7) parameetritega, mis sobivad uuritavate kemikaalide endokriinse toime tuvastamiseks. Katsejuhendi nr 422 ajakohastamise eesmärk oli lisada sõeluuringut käsitlevasse juhendisse teatavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida saab hinnata juhul, kui kokkupuuteperiood hõlmab mõnda tundlikku arenguperioodi (sünnieelset või varajast sünnijärgset perioodi).

4. Peale selle lisati katsejuhendisse nr 422 täiendavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida sisaldab ka katsejuhend nr 443 (sellele vastab käesoleva lisa peatükk B.56 „Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring“); need lõppnäitajad valiti lähtuvalt ühest teostatavusuuringust, milles käsitletakse asjaomaste lõppnäitajate lisamisega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi, ning võimalikust vajadusest katsemeetodit nende lisamiseks kohandada (6).

5. Käesolev katsemeetod on kavandatud piiratud hulga andmete saamiseks uuritava kemikaali mõju kohta isas- ja emasloomade paljunemisvõimele, näiteks sugunäärmete talitlusele, paaritumiskäitumisele, eostumisele, sügoodi arengule ja sünnitamisele. See ei ole ette nähtud kasutamiseks olemasolevate katsemeetodite B.31, B.34, B35 või B.56 alternatiivina ega nende asendamiseks.

LÄHTEKAALUTLUSED

6. Uuritava kemikaali mürgisust põhjustavate omaduste kindlakstegemiseks ja hindamiseks võib teha korduval suukaudsel manustamisel avalduva mürgisuse uuringu pärast seda, kui ägeda mürgisuse katsetest on saadud esialgsed andmed kemikaali mürgisuse kohta. Käesoleva meetodi kohane uuring võimaldab saada teavet võimalike terviseohtude kohta, mis avalduvad suhteliselt piiratud ajavahemiku jooksul toimuva korduva kokkupuute tagajärjel. Käesolev meetod hõlmab lihtsat korduvannustamisel põhinevat mürgisusuuringut, mida võib kasutada kemikaalide jaoks, mille puhul 90-päevase uuringu tegemine ei ole põhjendatud (näiteks kui tootmismaht ei ületa teatavat piiri), või eeluuringuna enne pikaajalise uuringu läbiviimist. Uuringu tegemisel tuleks järgida juhtpõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19, milles käsitletakse ohutuse hindamiseks kasutatavatel katseloomadel avalduvate kliiniliste tunnuste kindlakstegemist, hindamist ja kasutamist humaanse sekkumise vajadusele viitavate näitajatena (7).

▼**M8**

7. Peale selle hõlmab käesolev katsemeetod ka reproduktiiv-/arengutoksilisuse sõeluuringut ning seepärast saab seda ühtlasi kasutada uuritava kemikaali toksikoloogiliste omaduste hindamise varajases etapis või probleemse kemikaali uurimisel esialgse teabe saamiseks võimaliku mõju kohta isas- ja emasloomade paljunemisvõimele, näiteks sugunäärmete talitlusele, paaritumiskäitumisele, eostumisele, sügoodi arengule ja sünnitamisele. Käesolev katsemeetod ei võimalda saada ammendavat teavet kõikide paljunemisvõime ja arenguga seotud aspektide kohta. Eelkõige lubab see tuvastada sünnieelse kokkupuute tagajärjel sünnijärgselt avalduvaid ilminguid ja sünnijärgsest kokkupuutest tulenevat mõju üksnes piiratud ulatuses. Käesoleva meetodiga ei saa koguda tõendeid, mis lubaksid lõplikult kinnitada paljunemisele/arengule avalduva mõju puudumist; see on muu hulgas tingitud lõppnäitajate selektiivsusest ja uuringu lühikesest kestusest. Täheldatavaid positiivseid tulemusi aga on võimalik muudest reproduktiiv-/arengutoksilisuse uuringutest saadavate andmete puudumisel kasutada esialgseks ohuhindamiseks ning need aitavad teha otsuseid täiendavate uuringute tegemise vajaduse ja selliste uuringute ajastuse kohta.

8. Sisesekretsioonisüsteemiga seotud näitajaid käsitlevaid tulemusi tuleks vaadelda endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku (8) kontekstis. Nimetatud kontseptuaalses raamistikus on OECD täiendatud katsejuhendi nr 422 kohast meetodit käsitatud 4. taseme *in vivo* meetodina, mis võimaldab saada andmeid sisesekretsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajate kaudu tuvastatava kahjuliku mõju kohta. Sisesekretsioonisüsteemist sõltuvat signaali ei pruugita eraldi võetuna siiski pidada piisavaks tõendiks selle kohta, et uuritava kemikaali puhul on tegemist endokriinfunktsiooni kahjustava kemikaaliga.

9. Käesoleva katsemeetodi puhul pööratakse ühtlasi suurt tähelepanu konkreetse lõppnäitajana vaadeldavale neuroloogilisele mõjule ja rõhutatakse loomade hoolika kliinilise jälgimise vajadust, et saada võimalikult palju teavet. Meetod peaks võimaldama teha kindlaks kemikaalide võimaliku neurotoksilisuse, mida võib olla vaja täiendavalt põhjalikumalt uurida. Peale selle võib käesoleva meetodiga saada esialgset teavet immunoloogilise mõju kohta.

10. Täheldatavaid positiivseid tulemusi on võimalik muudest süsteemse mürgisuse, reproduktiiv-/arengutoksilisuse, neurotoksilisuse ja/või immunotoksilisuse uuringutest saadavate andmete puudumisel kasutada esialgseks ohuhindamiseks ning need aitavad teha otsuseid täiendavate uuringute tegemise vajaduse ja selliste uuringute ajastuse kohta. Katse tulemused võivad olla eriti kasulikud OECD sõeluuringute andmekogumi (SIDS) osana selliste olemasolevate kemikaalide hindamisel, mille kohta on vähe toksikoloogilist teavet või see puudub, ning sellist katset saab kasutada kahe eraldi katse asemel, milles hinnatakse vastavalt korduvannustamisel avalduvat mürgisust (OECD katsejuhend nr 407, mis vastab käesoleva lisa peatükile B.7) ja reproduktiiv-/arengutoksilisust (OECD katsejuhend nr 421, mis vastab käesoleva lisa peatükile B.63). Samuti võib seda kasutada ulatuslikumate paljunemisvõimet/arengut käsitlevate uuringute jaoks annusevahemiku kindlaksmääramiseks ning muudel asjakohaseks peetavatel juhtudel.

11. Üldjuhul eeldatakse, et tiinete ja mittetiinete loomade tundlikkus on erinev. Seepärast võib kõnealuses ühendkatses kahe eraldi katse läbiviimisega võrreldes olla keerulisem teha kindlaks sobivad annusemäärad, mis võimaldaksid üheaegselt hinnata nii üldist süsteemset mürgisust kui ka konkreetselt reproduktiiv-/arengutoksilisust. Peale selle võib üldise süsteemse mürgisusega seotud katsetulemuste tõlgendamine olla raskem kui korduvannustamisel põhineva eraldi katse tegemisel, eriti juhul, kui seeruminäitajaid ja histopatoloogilisi näitajaid ei analüüsita uuringus üheaegselt. Nende tehniliste aspektide keerukusest tulenevalt nõuab kõnealuse ühendatud sõeluuringu

▼M8

läbiviimine ulatuslikke kogemusi mürgisuse hindamisel. Teisest küljest võimaldab selline ühendkatse peale väiksema arvu loomade kasutamise paremini eristada paljunemisele/arengule avalduvat otsest mõju mõjust, mis ilmneb muu (süsteemse) mõju tagajärjel.

12. Käesoleva meetodi puhul on manustamisperiood pikem kui tavapärases 28-päevases korduvannustamisel põhinevas uuringus. Samal ajal on kummastki soost loomade arv igas rühmas väiksem kui olukorras, kus peale tavapärase 28-päevase korduvannustamisel põhineva uuringu tehakse veel ka reproduktiiv-/arengutoksilisuse sõeluuring.

13. Käesoleva katsemeetodi puhul eeldatakse, et uuritavat kemikaali manustatakse suu kaudu. Muu manustamisviisi kasutamise korral võib olla vaja teha meetodis muudatusi.

14. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

15. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

16. Uuritavat kemikaali manustatakse astmeliselt suurenevates annustes mitme rühma isas- ja emasloomadele. Isasloomade puhul peaks manustamine toimuma vähemalt nelja nädala kestel kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani, sealhulgas surmamiseelsel päeval (see hõlmab vähemalt kahte paaritumiseelset nädalat, paaritumisperioodi ja umbes kahte paaritumisjärgset nädalat). Kuna isasloomadel on paaritumiseelne manustamisperiood piiratud kestusega, ei pruugi viljakus olla eriti tundlik munanditele avalduva mürgisuse näitaja. Seepärast on vajateha munandite üksikasjalik histoloogiline analüüs. Kahe nädala pikkust paaritumiseelset manustamisperioodi koos järgneva paaritumise/viljakuse jälgimisega ning manustamisperioodi üldkestusega vähemalt neli nädalat, millele järgneb isasloomade sugunäärmete üksikasjalik histopatoloogiline analüüs, peetakse enamiku isasloomal täheldatavate viljakusele ja spermatogeneesile avalduva mõju ilmingute tuvastamiseks piisavaks.

17. Emasloomade puhul peaks manustamine toimuma kogu uuringu kestel. See hõlmab kahte paaritumiseelset nädalat (eesmärk on jälgida vähemalt kahte tervet innatsüklit), eostumisele eelnevat varieeruva pikkusega ajavahemikku, tiinuse kestust ja vähemalt kolmeteistkümne päeva pikkust sünnitusjärgset perioodi, mis kestab kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani ja hõlmab ka surmamiseelset päeva.

18. Kohanemisperioodile ja innatsükli manustamiseelsele hindamisele järgneva uuringu kestus sõltub emasloomade seisundist ning on umbes 63 päeva (vähemalt 14 päeva pikkune paaritumiseelne periood, (kuni) 14 päeva pikkune paaritumisperiood, 22 päeva pikkune tiinusperiood ja 13 päeva pikkune imetamisperiood).

19. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi iga päev hoolikalt mürgisusnähtude suhtes. Uuringu kestel surnud või surmatud loomad lahatakse ning uuringu lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

▼M8

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

20. Käesolev katsemeetod on kavandatud kasutamiseks rotil. Kui katsejuhendis nr 422 kirjeldatud näitajaid hinnatakse mõne muu liigi närilistel, tuleks seda üksikasjalikult põhjendada. Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemise rahvusvahelises valideerimisprogrammis, mille puhul on lähtutud katsejuhendist nr 407, kasutati ainsa liigina rotte. Ei tohiks kasutada liine, kus sigivus on väike või kus teadaolevalt esineb sageli arenguhäireid. Tuleks kasutada terveid varem paaritamata loomi, keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomi tuleks iseloomustada liigi, liini, soo, kehamassi ja vanuse järgi. Uuringu alguses peaksid kasutatavate loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle ± 20 % kummastki soost loomade keskmisest kehamassist. Kui uuring viiakse läbi pikaajalise või tervet põlvkonda hõlmava uuringu eeluuringuna, tuleks mõlemas uuringus soovitatavalt kasutada samast liinist ja sama päritolu loomi.

Pidamis- ja söötmistingimused

21. Kõik katsetoimingud peaksid vastama kohalikele laboriloomade hooldamise normidele. Katseloomade ruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärast laborisööta ja piiramatus koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil.

22. Loomade pidamisel tuleks kasutada väikesi samasooliste isendite rühmi; loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud. Rühmas pidamisel ei tohiks puuris olla rohkem kui viis looma. Paaritamine peaks toimuma selleks sobivas puuris. Tiined emasloomad tuleks paigutada igaüks eraldi puuri, kus on olemas pesamaterjal. Imetavad emasloomad paigutatakse igaüks eraldi puuri koos järglaskonnaga.

23. Sööta tuleks korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes. Asjaomase sööda proov tuleks kuni katseprotokolli lõpliku valmimiseni alles hoida.

Loomade ettevalmistamine

24. Terved noored täiskasvanud loomad jagatakse juhuvaliku alusel katserühmadesse ja puuridesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Loomad identitakse üheselt ja neil lastakse enne uuringu algust puuris vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda.

Annuste ettevalmistamine

25. Uuritavat kemikaali on soovitatav manustada suu kaudu, välja arvatud juhul, kui mõnda muu manustamisviisi peetakse sobivamaks. Uuritava kemikaali suukaudseks manustamiseks kasutatakse tavaliselt toitmissondi; selle asemel võib siiski kasutada ka sööda või joogiveega manustamist.

26. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda vesilahuse või veepõhise suspensiooni ja seejärel õlilahuse või õlipõhise suspensiooni (nt maisiõli) kasutamist ning pärast seda lahustamist mõnes muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul peaksid olema teada selle mürgisusnäitajad. Tuleks teha kindlaks uuritava kemikaali püsivus ja homogeensus kandeaines.

▼M8

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

27. Soovitatavalt peaks igas rühmas olema alguses vähemalt 10 isaslooma ja 12–13 emaslooma. Emasloomi hinnatakse kokkupuute eel innatsükli alusel ja loomad, kelle innatsükkel erineb tavapärasest 4–5 päeva pikkusest tsüklist, jäetakse uuringust välja; seepärast on soovitatav kasutada suuremat arvu emasloomi, et igas rühmas oleks lõpuks 10 emaslooma. Eeldatavalt tiinestub igas rühmas vähemalt 8 emaslooma – seda peetakse tavapäraselt minimaalseks vastuvõetavaks tiinestumismääraks –, välja arvatud juhul, kui ilmneb märkimisväärne mürgine mõju. Eesmärk on saada piisav arv tiineid emasloomi, et oleks võimalik usaldusväärselt hinnata uuritava kemikaali võimet mõjutada viljakust, tiinust, ema- ja imetamiskäitumist ning F_1-põlvkonna järglaste kasvu ja arengut eostamisest kuni kolmeteistkümnenda sünnijärgse päevani. Kui osa loomi on kavas surmata juba katse ajal, tuleks suurendada loomade arvu nende loomade arvu võrra, kes surmatakse plaanijärgselt enne katse lõppu. Tuleks kaaluda võimalust luua kontrollrühma ja suurima annusega töödeldava rühma juurde täiendrühm, millesse kuulub kummastki soost viis looma, et jälgida vähemalt 14 päeva jooksul pärast manustamise lõpetamist süsteemse mürgise mõju pöörduvust, püsivust või viivitusega avaldumist. Täiendrühma loomi ei paaritata ja neid ei kasutata seega reproduktiiv-/arengutoksilisuse hindamisel.

Annused

28. Üldjuhul tuleks kasutada vähemalt kolme katserühma ja ühte kontrollrühma. Sobivate üldise mürgisuse andmete puudumisel võib kasutatavate annuste kindlaksmääramise hõlbustamiseks teha annusevahemiku kindlaksmääramise uuringu, kus kasutatakse samast liinist ja sama päritolu loomi. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda täpselt samal viisil kui katserühma loomi; ainus erinevus seisneb uuritava kemikaali manustamata jätmises. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleks võrdlusrühma loomadele manustada kandeainet suurimas kasutatavas koguses.

29. Annuste valimisel tuleks võtta arvesse kõiki kättesaadavaid mürgisusandmeid ja (toksiko)kineetilisi andmeid. Samuti tuleks arvesse võtta, et tiinete ja mittetiinete loomade tundlikkus võib olla erinev. Suurim annus tuleks valida nii, et kemikaal avaldaks mürgist mõju, kuid ei põhjustaks surma ega ilmseid kannatusi. Seejärel tuleks valida rida järk-järgult vähenevaid annuseid, mis võimaldaksid tõendada mõju sõltuvust annusest ja väikseima annuse puhul kahjuliku mõju puudumist. Sageli on eri annuste vaheline optimaalne erinevus kahe- kuni neljakordne ning üksteisest väga palju (näiteks üle 10 korra) erinevate annuste kasutamise asemel on tihti soovitatav lisada neljas katserühm.

30. Kui täheldatakse üldist mürgisust (nt kehamassi vähenemine, mõju maksale, südamele, kopsudele või neerudele jne) või muid muutusi, mis ei pruugi olla tingitud mürgisusest (nt väiksem söödatarbimine, maksa suurenemine), tuleks täheldatud mõju sisesekretsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajatele tõlgendada ettevaatusega.

Piirsisalduskatse

31. Kui käesoleva meetodi kohaselt läbi viidud suukaudse manustamise uuringus, milles kasutatakse ainsa annusena annust vähemalt 1 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas või sööda või joogiveega manustamise korral sellega samaväärset protsentuaalset sisaldust söödas või joogivees (see määratakse kindlaks kehamassi mõõtmise alusel), ei täheldata mürgist mõju ja kui mürgisus ei ole uuritava kemikaaliga struktuurilt sarnaste ainetega

▼M8

saadud andmete põhjal ootuspärane, ei pruugita pidada mitme eri annusega täismahus uuringu tegemist vajalikuks. Piirsalduskatse tulemused on kohaldatavad, kui inimese kokkupuutega seotud andmed ei viita vajadusele kasutada suuremat annusemäära. Muu manustamisviisi korral, näiteks sissehingamise teel või naha kaudu manustamisel võib uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest tulenevalt olla tihti vaja kasutada suurimat saavutatavat kokkupuutemäära.

Annuste manustamine

32. Uuritavat kemikaali manustatakse loomadele seitsmel päeval nädalas. Kui manustamiseks kasutatakse toitmissondi, tuleks kemikaali loomadele manustada ühe annusena maosondi või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Suurim korraga manustatav vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. See kogus ei tohiks olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Katseskasutatava vedelikukoguse varieeruvuse minimeerimiseks tuleks reguleerida uuritava kemikaali kontsentratsiooni nii, et lahuse maht oleks kõikide annuste puhul ühesugune; see ei ole nõutav ärritava või söövitava uuritava kemikaali puhul, mille mõju kontsentratsiooni suurenedes tavaliselt tugevneb.

33. Sööda või joogiveega manustatava uuritava kemikaali puhul on oluline tagada, et seda kasutatakse koguses, mis ei muuda tavapärast toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas muutumatut kontsentratsiooni söödas (ppm) või looma kehamassi suhtes muutumatut annusemäära; tuleks täpsustada, kumba võimalust kasutatakse. Toitmissondi kaudu manustatava uuritava kemikaali puhul peaks manustamine toimuma igal päeval sarnasel kellaajal ning annusemäära tuleks vähemalt kord nädalas kohandada, et see püsiks looma kehamassi suhtes muutumatuna. Kui ühendkatse viiakse läbi pikaajalise või täismahus reproduktiivtoksilisuse uuringu eeluuringuna, tuleks mõlemas uuringus kasutada samasugust sööta.

Katse ajakava

34. Annuste manustamist tuleks kummagi soo puhul alustada kaks nädalat enne paaritamist pärast seda, kui loomadel on lastud vähemalt viis päeva kohaneda ja emasloomi on hinnatud lähtuvalt innatsükli tavapärasest kestusest (töötlemiseelse kahe nädala pikkuse perioodi vältel). Uuringu ajakava peaks olema selline, et innatsükli hindamist alustatakse varsti pärast seda, kui loomad on saanud täielikult suguküpseks. See aeg võib olla eri rotiliinidel ja eri laborites veidi erinev: näiteks Sprague Dawley rottidel saabub suguküpsus 10 nädala vanuses ja Wistari rottidel umbes 12 nädala vanuses. Järglastega emasloomad tuleks surmata 13. sünnitusjärgsel päeval või veidi hiljem. Järglastega emasloomi ja järglasi ei pea tingimata surmama samal päeval, kui järglastega emasloomadel eelistatakse lasta enne vereproovi võtmist hommikuni paastuda. Sünnitamispäeva (päev, mil sünnitus lõpeb) loetakse sünnitusjärgseks 0-päevaks. Emasloomad, kellel ei täheldata paaritumise ilminguid, surmatakse 24–26 päeva pärast paaritumisperioodi viimast päeva. Paaritumisperioodi vältel jätkatakse kummastki soost loomadele kemikaali manustamist. Isasloomadele manustamist tuleks paaritumisperioodi järgselt jätkata vähemalt seni, kuni manustamisperioodi algusest on möödunud kokku minimaalselt 28 päeva. Seejärel loomad surmatakse või teise võimalusena jätkatakse neile kemikaali manustamist, et viia võimaluse korral läbi teine paaritamine, kui seda peetakse asjakohaseks.

35. Tiinestunud emasloomade puhul tuleks igapäevast manustamist jätkata kogu tiinuse vältel ning vähemalt kuni 13. sünnitusjärgse päevani, sealhulgas nimetatud päeval, või kuni surmamiseelse päevani. Uuringute puhul, kus uuritavat kemikaali manustatakse sissehingamise teel või naha kaudu, tuleks manustamist jätkata vähemalt kuni 19. tiinuspäevani, sealhulgas nimetatud päeval, ning taasalustada seda võimalikult varakult ja mitte hiljem kui 4. sünnitusjärgsel päeval.

▼M8

36. Järelvaatluste jaoks ette nähtud täiendrühma kasutamisel jäetakse sellise rühma loomad paaritamata. Neid tuleks pärast järglastega emasloomade esimest plaanijärgset surmamist pidada veel vähemalt 14 päeva ja selle aja jooksul ei tohiks neile kemikaali manustada, et oleks võimalik hinnata mürgise mõju viivitusega avaldumist või selle püsivust või mürgisest mõjust taastumist.

37. Katse skemaatiline ajakava on esitatud 2. liites.

Innatsükkel

38. Enne töötlemise alustamist tuleks jälgida innatsüklit ning valida selle alusel uuringusse emasloomad, kelle tsükkel on korrapärane (vt punkt 27). Tupeäigeid tuleks igapäevaselt hinnata ka alates töötlemisperioodi algusest kuni paaritumise ilmingute tuvastamiseni. Kui on kahtlus, et innatsükkel võib pärast manustamise alustamist ägeda stressi mõjul muutuda, võib katseloomi laboris 2 nädala vältel uuritava kemikaaliga töödelda ning seejärel koguda paaritumiseelsel perioodil innatsükli jälgimiseks vähemalt kahe nädala jooksul iga päev tupeäigeid ja jätkata jälgimist ka paaritumisperioodil, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid. Tupe-/emakakaelarakkude võtmisel tuleks olla ettevaatlik, et mitte kahjustada limaskesta, kuna see võib põhjustada pseudotiinuse teket (8, 9).

Paaritamine

39. Käesoleva meetodi kohases uuringus tuleks üldjuhul kasutada paaritamisel suhet 1: 1 (üks isasloom ühe emaslooma kohta). Erandi võib teha juhul, kui isasloomad juhtuvad surema. Emaslooma tuleks hoida sama isaslooma juures seni, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid või on möödunud kaks nädalat. Emasloomi tuleks igal hommikul uurida sperma või tupekorgi esinemise suhtes. Tiinuse 0-päevaks loetakse päeva, mil paaritumise toimumine leiab kinnitust (leitakse tupekork või spermat). Kui paaritamine ebaõnnestub, võib kaaluda emaslooma uuesti paaritamist sama rühma viljakaks osutunud isasloomaga.

Pesakonna suurus

40. Neljandal sünnijärgsel päeval võib iga pesakonna suurust korrigeerida; selleks kõrvaldatakse juhuvaliku alusel üleliigsed järglased nii, et pesakonda jääks sõltuvalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest võimalikult täpselt neli või viis järglast kummagi soo kohta. Üleliigsetest järglastest kahelt tuleks võtta vereproov, moodustada nendest koondproov ja kasutada seda seerumi T_4-sisalduse määramiseks. Järglaste selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi või anogenitaalse vahemaa (AGD) alusel, ei ole sobiv. Kui emaste või isaste järglaste arv ei võimalda jätta pesakonda nelja või viit järglast kummastki soost, on vastuvõetav ka osaline korrigeerimine (nt kuus isast ja neli emast). Kui pesakond jääks kõrvaldamise tagajärjel väiksemaks kui kõrvaldamisega saavutatav soovitud sihtarv (8 või 10 järglast pesakonna kohta), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui kõrvaldamisega saavutatava soovitud sihtarvuga võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T_4-sisalduse hindamiseks.

41. Kui pesakonna suurust ei korrigeerita, surmatakse 4. sünnijärgsel päeval igast pesakonnast kaks järglast ning neilt võetakse vereproov seerumi kilpnäärmehormoonisisalduse mõõtmiseks. Võimaluse korral peaksid kõnealused kaks järglast igast pesakonnast olema emased, et võimaldada isaste järglaste kasutamist nisade esinemise hindamiseks; see soovitus ei kehti juhul, kui kõnealuse kahe järglase eemaldamisel ei jääks pesakonda ühtki emast, keda uuringu lõpus hinnata. Kui pesakonda jääks kõrvaldamise tagajärjel vähem kui 8 või 10 järglast (olenevalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui pesakonna tavapärase suurusega võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T_4-sisalduse hindamiseks.

▼M8

Vaatlused

42. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas, igal päeval soovitatavalt samal ajal või samadel aegadel; seejuures tuleks võtta arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju maksimaalse avaldumise aega. Tuleks registreerida loomade tervislik seisund. Kõiki loomi kontrollitakse haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks vähemalt kaks korda päevas.

43. Kõikide paaritatavate loomade puhul tuleks läbi viia üksikasjalikud kliinilised vaatlused üks kord enne uuritava kemikaali manustamist (võimaldamaks sama loomaga saadud tulemuste võrdlemist) ning seejärel vähemalt kord nädalas. Need vaatlused tuleks teha standardalal väljaspool looma pidamiseks kasutatavat puuri ja igal vaatluste tegemise päeval soovitatavalt samal kellaajal. Tulemused tuleks hoolikalt registreerida; selleks tuleks soovitatavalt kasutada katset läbi viivas laboris selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et katsetingimused varieeruksid võimalikult vähe ja vaatlusi teeksid soovitatavalt isikud, kes ei ole asjaomasest töötlemisest teadlikud. Tuleks registreerida vähemalt järgmised ilmingud: nahal, karvastikus, silmades ja limaskestadel täheldatavad muutused, sekreetide ja eritiste esinemine ning autonoomse närvisüsteemiga seotud ilmingud (nt pisaravoolus, piloerektsioon, pupillide suuruse muutus, ebaharilik hingamisrütm). Peale selle tuleks registreerida muutused kõnnakus, kehahoius ja selles, kuidas loomad nendega ümberkäimisele reageerivad, samuti klooniliste ja tooniliste liigutuste esinemine, stereotüüpia (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine), raske või kauakestnud sünnitus ja kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi kõndimine) (10).

44. Uuringu kestel tuleks igast rühmast juhuvaliku alusel valitud viiel isasloomal ja viiel emasloomal hinnata ühel korral sensoorseid reaktsioone eri liiki ärritajatele (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptiivsetele ärritajatele) (8, 9, 11), haardetugevust (12) ja motoorset tegevust (13). Asjaomaste võimalike meetodite täpsem kirjeldus on esitatud vastavate viidete kohastes allikates. Viidatud meetodite asemel võib siiski kasutada ka muid meetodeid. Isasloomadel tuleks kõnealused funktsionaalsed vaatlused läbi viia manustamisperioodi lõppjärgus veidi enne plaanijärgset surmamist, kuid enne hematoloogiliseks uuringuks või kliiniliseks biokeemiliseks analüüsiks vereproovi võtmist (vt punktid 53–56, sh joonealune märkus 1). Emasloomad peaksid nende funktsionaalsete vaatluste ajal olema sarnases füsioloogilises seisundis ja neid tuleks soovitatavalt vaadelda ühel korral viimasel imetamisnädalal (nt 6.–13. imetamispäeval) veidi enne plaanijärgset surmamist. Ajavahemik, mille vältel järglased on emast eraldatud, peaks olema võimalikult lühike.

45. Uuringu lõppjärgus ühel korral tehtavad funktsionaalsed vaatlused võib ära jätta, kui uuring viiakse läbi järgnevalt tehtava subkroonilise mürgisuse 90-päevase uuringu või pikaajalise uuringu eeluuringuna. Sellisel juhul tuleks kõnealused funktsionaalsed vaatlused läbi viia vastava järeluuringu käigus. Teisest küljest aga võivad käesoleva meetodi kohase korduvannustamisel põhineva uuringu käigus tehtud funktsionaalsete vaatluste andmed hõlbustada järgnevalt tehtava subkroonilise mürgisuse uuringu või pikaajalise uuringu jaoks annusemäärade valimist.

46. Funktsionaalsed vaatlused võib erandkorras ära jätta ka rühmade puhul, kus täheldatakse nii ulatuslikke mürgisusnähte, et see mõjutab märkimisväärselt funktsionaalse hindamise tulemuslikkust.

47. Tiinuse kestus tuleks registreerida; selle arvutamisel lähtutakse tiinuse 0-päevast. Iga pesakonda tuleks pärast sündi võimalikult varakult hinnata, et teha kindlaks järglaste arv ja sugu, surnultsünnid, elussünnid, kängunud järglaste (vastavatest kontrolljärglastest palju väiksemate järglaste) arv ja silmaga nähtavate kõrvalekallete esinemine.

▼M8

48. Elus järglased tuleks loendada ja määrata nende sugu ning pesakonda tuleks kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Peale paaritatavatel loomadel tehtavate vaatluste tulemuste (vt punktid 43–44) tuleks registreerida ka kõik järglaste ebatavalise käitumise ilmingud.

49. Kõikidel järglastel tuleks ajavahemikul sünnijärgsest 0-päevast kuni 4. sünnijärgse päevani mõõta ühel ja samal päeval AGD. Järglaste kehamassi andmed tuleks koguda AGD mõõtmise päeval ja AGD tuleks normaliseerida järglase suurust kajastava näitaja, soovitatavalt kehamassi kuupjuure suhtes (14). Isastel järglastel tuleks 12. või 13. sünnijärgsel päeval loendada nisade/areoolide arv, nagu on soovitatud OECD katsejuhendis nr 151 (15).

Kehamass ja sööda/vee tarbimine

50. Isas- ja emasloomi tuleks kaaluda esimesel manustamispäeval ning seejärel vähemalt kord nädalas, samuti surmamise ajal. Tiinuse ajal tuleks emasloomi kaaluda tiinuse 0-päeval, 7., 14. ja 20. päeval, samuti tuleks neid kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Nimetatud vaatluste tulemused tuleks esitada eraldi iga täiskasvanud looma kohta.

51. Paaritumiseelsel perioodil ning tiinuse ja imetamise ajal tuleks söödatarbimist mõõta vähemalt kord nädalas. Paaritumisperioodil ei ole söödatarbimise mõõtmine kohustuslik. Kui uuritavat kemikaali manustatakse veega, tuleks eelnimetatud perioodidel mõõta ka veetarbimist.

Hematoloogiline analüüs

52. Uuringu vältel tuleks igast rühmast juhuvaliku alusel valitud viiel emasloomal ja viiel isasloomal viia ühel korral läbi hematoloogiline analüüs järgmiste näitajate määramiseks: hematokrit, hemoglobiinisisaldus, erütrotsüütide arv, retikulotsüütide arv, leukotsüütide üldarv ja eri tüüpi leukotsüütide arv, vereliistakute arv ja vere hüübimisaeg/hüübimisvõime. Kui uuritav kemikaal või mõni selle võimalikest metaboliitidest on või võib olla oksüdeerivate omadustega, tuleks teha muu hulgas kindlaks veel ka methemoglobiinisisaldus ja Heinzi kehakeste esinemine.

53. Vereproov tuleks võtta kindlaksmääratud kohast. Emasloomad peaksid proovivõtu ajal olema sarnases füsioloogilises seisundis. Tiinuse algusaja varieeruvusega seotud praktilistest raskustest tulenevalt võib emasloomadelt vereproovi võtta juba paaritumiseelse perioodi lõpus, selmet võtta see loomade humaanse surmamise käigus või vahetult enne seda. Isasloomadelt tuleks vereproov võtta loomade humaanse surmamise käigus või vahetult enne seda. Teise võimalusena võib isasloomadelt vereproovi samuti võtta paaritumiseelse perioodi lõpus, kui emasloomade puhul eelistatakse seda proovivõtuaega.

54. Vereproove tuleks säilitada sobivates tingimustes.

Kliiniline biokeemiline analüüs

55. Kliinilise biokeemilise analüüsi jaoks, mille eesmärk on hinnata kudedes avalduvat olulist mürgist mõju ning konkreetset mõju neerudele ja maksale, tuleks kasutada kõnealuse igast rühmast valitud viie emaslooma ja viie

▼M8

isaslooma vereproove. Loomadel on soovitatav enne vereproovi võtmist hommikuni paastuda [1]. Plasma või seerumi analüüs peaks hõlmama naatriumi, kaaliumi, glükoosi, kolesterooli üldsisalduse, karbamiidi, kreatiniini, valgu üldsisalduse ja albumiini, vähemalt kahe maksarakkudele avalduvale toimele osutava ensüümi (näiteks alaniini aminotransferaasi, aspartaadi aminotransferaasi ja sorbitooli dehüdrogenaasi) ning sapphapete määramist. Teatavatel juhtudel võib kasulikku teavet saada veel muude (maksas või mujal toodetud) ensüümide ja bilirubiini määramisest.

56. Vereproovid võetakse kindlaksmääratud kohast järgmise kava alusel:

— igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt 4. sünnijärgsel päeval, kui järglaste arv seda võimaldab (vt punktid 40-41),

— kõikidelt järglastega emasloomadelt ja igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt surmamise ajal 13. päeval ning

— kõikidelt täiskasvanud isasloomadelt surmamise ajal.

Kõiki vereproove säilitatakse sobivates tingimustes. Järglastelt 13. päeval võetud vereproovides ja täiskasvanud isasloomade vereproovides analüüsitakse kilpnäärmehormoonide (T_4) sisaldust seerumis. Kui see on asjakohane, hinnatakse T_4 sisaldust ka järglastega emasloomade vereproovides ja järglastelt 4. päeval võetud vereproovides. Kui see on asjakohane, võib soovi korral mõõta ka muude hormoonide sisaldust. Järglaste vere võib kilpnäärmehormoonide analüüsimiseks pesakonnakaupa kokku koondada. Soovitatavalt tuleks mõõta kilpnäärmehormoonide (T_4 ja TSH) üldsisaldust.

57. Uuringu viimasel nädalal võib igast rühmast juhuvaliku alusel valitud viielt isasloomalt koguda teatud kindla aja jooksul uriiniproovi ja määrata uriinianalüüsi käigus järgmised näitajad: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, valgusisaldus, glükoosisisaldus ja veresisaldus / vererakkude sisaldus.

58. Peale selle tuleks kaaluda üldistele koekahjustustele osutavate seerumimarkerite uurimist. Kui uuritav kemikaal on oma teadaolevatest omadustest tulenevalt võimeline mõjutama asjaomast ainevahetusprofiili või kui esineb sellekohane kahtlus, peaks määramine muu hulgas hõlmama veel ka kaltsiumi, fosfaati, paastumisjärgselt määratavaid triglütseriide ja glükoosi, teatavaid hormoone, methemoglobiini ja koliini esteraasi. Kõnealused näitajad tuleb igal konkreetsel juhul eraldi kindlaks määrata.

59. Hormoonide määramisel võivad varieeruvust ja absoluutset kontsentratsiooni mõjutada järgmised tegurid:

— surmamise aeg tulenevalt asjaolust, et hormoonide kontsentratsioon ööpäeva jooksul muutub;

[1] Mitme seerumist või plasmast määratava näitaja, eelkõige glükoosi mõõtmisel on soovitatav hommikuni paastuda, peamiselt seepärast, et söömise korral oleks tulemuste varieeruvus paratamatult suurem ning see segaks nõrgema mõju tuvastamist ja muudaks andmete tõlgendamise raskeks. Teisest küljest aga võib hommikuni paastumine häirida (tiinete) loomade üldist ainevahetust ning mõjutab piimaeritust ja imetamiskäitumist, samuti võib see muuta igapäevast uuritava kemikaaliga kokkupuutumise määra, eelkõige uuringutes, kus kasutatakse söödaga manustamist. Kui loomadel lastakse hommikuni paastuda, tuleks kliiniline biokeemiline analüüs teha isasloomade puhul uuringu neljandal nädalal pärast funktsionaalsete vaatluste läbiviimist. Järglastega emasloomi tuleks pärast järglaste eemaldamist (seda tehakse näiteks 13. sünnijärgsel päeval) veel ühe päeva elus hoida. Neil tuleks lasta 13. imetamispäevast 14. imetamispäeva hommikuni paastuda ja kasutada kliiniliste biokeemiliste näitajate määramiseks surmamise ajal võetud vereproovi.

▼M8

— surmamisviis – tuleks hoiduda tekitamast loomadele tarbetut stressi, mis võib mõjutada hormoonide kontsentratsiooni;

— hormoonide määramise komplektid, milles kasutatavad standardkõverad võivad olla erinevad.

60. Konkreetselt hormoonide määramiseks ette nähtud eri plasmaproovid tuleks koguda umbes samal kellaajal. Hormoonisisalduse analüüsimisel saadavad arvväärtused on müügilolevate eri katsekomplektide puhul erinevad.

61. Kui varasemad võrdlusandmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliiniliste biokeemiliste näitajate määramist enne manustamisperioodi algust või soovitatavalt loomadel, kes ei kuulu ühessegi katserühma. Emasloomade puhul tuleb andmete saamiseks kasutada imetavaid loomi.

PATOLOOGILINE ANALÜÜS

Täielik lahkamine

62. Kõikidele uuringus kasutatud täiskasvanud loomadele tuleks teha täielik, põhjalik lahkamine, mille käigus uuritakse hoolikalt keha välispinda, kõiki avausi ning kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisu. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Tuleks registreerida pesastumiskohtade arv. Lahkamispäeval tuleks analüüsida tupeäiet, et teha kindlaks innatsükli etapp ja võimaldada korreleerimist emassuguelundite histopatoloogilise analüüsi tulemustega.

63. Kõikide täiskasvanud isasloomade munandid ja munandimanused ning eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega tuleks vajaduse korral vabastada nende külge jäänud kudedest ja kuivamise ärahoidmiseks tuleks elundite märgmass määrata võimalikult kiiresti pärast nende väljalõikamist. Peale selle võib soovi korral kaaluda isasloomade puhul sellised elundid nagu pärakutõsturlihase ja sibulakäsnkeha-lihase kompleks, Cowperi näärmed ja sugutilukk ning emasloomade puhul munasarjade paar (märgmass) ja emakas (koos emakakaelaga); kui seda tehakse, peaks kaalumine toimuma võimalikult kiiresti pärast elundite väljalõikamist. Kõikide täiskasvanud loomade munasarjad, munandid, munandimanused, suguelundid ja kõik makroskoopiliste kahjustustega elundid tuleks säilitada.

64. Kõikidelt täiskasvanud isas- ja emasloomadelt ning igast pesakonnast ühelt isaselt ja ühelt emaselt 13 päeva vanuselt järglaselt võetud kilpnääret tuleks säilitada fikseerimislahuses, mis on järgneva kavandatud histopatoloogilise analüüsi läbiviimiseks kõige sobivam. Kilpnäärme massi võib määrata pärast fikseerimist. Liigsed koed tuleks samuti eemaldada väga ettevaatlikult alles pärast fikseerimist, et kudesid mitte kahjustada. Koekahjustus võib mõjutada histopatoloogilise analüüsi tulemusi. Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast vahetult enne loomade humaanset surmamist või selle ajal ja neid tuleks säilitada sobivates tingimustes (vt punkt 56).

▼M8

65. Peale selle tuleks igast rühmast juhuvaliku alusel valitud vähemalt viielt täiskasvanud isas- ja emasloomalt (juhuvalik ei hõlma loomi, kes on leitud olevat surmaeelses seisundis ja/või on enne uuringu lõppu humaanselt surmatud) võtta maks, neerud, neerupealised, harknääre, põrn, aju ja süda, eemaldada vastavalt vajadusele nende külge jäänud koed ning määrata kuivamise ärahoidmiseks võimalikult kiiresti pärast väljalõikamist nende märgmass. Nii koetüübi kui ka kavandatud järgneva histopatoloogilise uuringu jaoks kõige sobivamas fikseerimislahuses tuleks säilitada järgmisi kudesid: kõik silmaga nähtavate kahjustustega koed, aju (representatiivsed piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju ja ajusild), seljaaju, silm, magu, peensool ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, neerud, neerupealised, põrn, süda, harknääre, hingetoru ja kopsud (säilitamiseks täidetakse need fikseerimislahusega ja sukeldatakseseejärel lahusesse), sugunäärmed (munandid ja munasarjad), suguelundid (emakas ja emakakael, munandimanused, eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega), tupp, kusepõis, lümfisõlmed (peale manustamiskohale kõige lähemal asuva lümfisõlme tuleks võtta labori kogemustest lähtuvalt veel teinegi lümfisõlm (16)), perifeerne närv (istmiku- või sääreluunärv), soovitatavalt lihase läheduses, skeletilihas ning luu koos luuüdiga (lõik või teise võimalusena värskelt aspireeritud luuüdi preparaat). Munandid on soovitatav fikseerida Bouini või muudetud Davidsoni fikseerimislahusesse sukeldamise teel (16, 17, 18); formaliinis fikseerimine ei ole nende kudede puhul soovitatav. Fikseerimislahuse kiire sissetungimise võimaldamiseks võib elundi kummaski otsas valkjaskesta ettevaatlikult väikese sügavuseni nõelaga läbi torgata. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Tuleks säilitada ka kõik elundid, mida uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt peetakse tõenäoliseks sihtelundiks.

66. Sisesekretsioonisüsteemiga seotud mõju kohta võib saada väärtuslikku teavet järgmiste kudede uurimisel: sugunäärmed (munasarjad ja munandid), suguelundid (emakas koos emakakaelaga, munandimanused, seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega, eesnäärme dorsolateraalne ja ventraalne osa), tupp, ajuripats, isaslooma rinnanäärmed ja neerupealised. Isaslooma rinnanäärmetes aset leidvad muutused on ebapiisavalt dokumenteeritud, kuid see näitaja võib olla väga tundlik östrogeense toimega ainete suhtes. Punktis 65 loetlemata elundite/kudede analüüsimine ei ole kohustuslik.

67. Surnud järglasi ja 13. sünnijärgsel päeval või varsti pärast seda surmatud järglasi tuleks miinimumnõudena väliselt hoolikalt uurida silmaga nähtavate kõrvalekallete suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata välistele suguelunditele, mida tuleks uurida arenguhäirete ilmingute suhtes.

Histopatoloogiline analüüs

68. Kontrollrühmast ja suurima annusega töödeldud rühmast valitud loomadelt pärit säilitatud elundite ja kudede puhul tuleks viia läbi täismahus histopatoloogiline uuring (seejuures tuleks pöörata erilist tähelepanu spermatogeneesi etappidele isaslooma sugunäärmetes ja munandite interstitsiaalrakustruktuuri histopatoloogilisele analüüsile). Vajaduse korral võib uurida ka järglastelt ja ülejäänud täiskasvanud loomadelt võetud kilpnääret. Kui suurima annusega töödeldud rühmas täheldatakse manustamisega seotud muutusi, peaks kõnealune analüüs hõlmama ka teiste annuserühmade loomi. Täiendav üksikasjalik teave sisesekretsioonisüsteemi kudede väljalõikamise, fikseerimise, neist lõikude tegemise ja nende histopatoloogilise analüüsi kohta on esitatud histopatoloogilise analüüsi juhendis (10).

69. Tuleks uurida kõiki silmaga nähtavaid kahjustusi. NOAELi kindlakstegemise hõlbustamiseks tuleks analüüsida ka teiste annuserühmade loomade sihtelundeid, eelkõige sellistest rühmadest pärit sihtelundeid, mida iseloomustavate tulemuste põhjal saab väidetavalt määrata kindlaks NOAELi.

▼M8

70. Täiendrühma kasutamise korral tuleks histopatoloogilise analüüsi raames hinnata neid kudesid ja elundeid, kus katserühmade loomade puhul täheldati mõju avaldumist.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

71. Andmed tuleks esitada iga looma kohta eraldi. Peale selle tuleks esitada kõik andmed kokkuvõtliku tabeli kujul, kus on iga katserühma puhul toodud ära loomade arv katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel surmatud loomade arv ning surma või humaanse surmamise aeg, viljakate loomade arv, tiinete emasloomade arv, mürgisusnähtudega loomade arv, mürgisusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise mõju ilmnemisaeg, kestus ja tugevus, histopatoloogiliste muutuste liik ja kõik asjakohased andmed pesakonna kohta. Paljunemisele/arengule avalduva mõju hindamiseks väga kasulikuks osutunud aruandevorm kokkuvõtliku tabeli kujul on esitatud 3. liites.

72. Numbrilisi tulemusi tuleks võimaluse korral hinnata asjakohase üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Eri annuste puhul täheldatud mõju võrdlemisel tuleks hoiduda mitme t-testi kasutamisest. Kasutatavad statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis. AGD ja nisade esinemise statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonnas ilmnevat mõju. Vajaduse korral käsitatakse analüüsiüksusena pesakonda. Järglaste kehamassi statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonna suurust. Uuringu piiratud ulatusest tulenevalt on tulemuste olulisuse tuvastamiseks tehtava statistilise analüüsi väärtus paljude lõppnäitajate, eelkõige paljunemisega seotud lõppnäitajate puhul piiratud. Mõned kõige sagedamini kasutatavatest meetoditest, eelkõige parameetrilised testid keskmise suundumuse näitajate analüüsimiseks, on ebasobivad. Statistilise analüüsi kasutamisel tuleks valida meetod, mis on uuritava muutuja väärtuste jaotuse analüüsimiseks sobiv, ning see valik tuleks teha enne uuringu alustamist.

Tulemuste hindamine

73. Käesoleva meetodi kohase mürgisusuuringu tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt täheldatud mõjust, lahkamistulemustest ja mikroskoopilistest leidudest. Hindamine hõlmab seose kindlakstegemist uuritava kemikaali annuse ja kõrvalekallete – sealhulgas silmaga nähtavate kahjustuste, tuvastatud sihtelunditele avalduva mõju, viljatuse, kliiniliste kõrvalekallete, paljunemisvõimele ja pesakonnale avalduva mõju, kehamassi muutuste, suremusele avalduva mõju ja mis tahes muu mürgise mõju – esinemise või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel.

74. Isasloomade töötlemise lühiajalisuse tõttu tuleks isasloomade paljunemisele avalduva mõju hindamisel vaadelda munandite ja munandimanuste histopatoloogilise analüüsi tulemusi koos viljakusandmetega. Ühtlasi võib uuringutulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks olla kasulik kasutada kontrollidega saadud varasemaid paljunemist/arengut käsitlevaid andmeid (nt pesakonna suuruse, AGD, nisade esinemise või seerumi T_4-sisalduse kohta), kui need on olemas.

75. Kvaliteedikontrolli eesmärgil on soovitatav koguda kontrolle käsitlevaid varasemaid andmeid ja arvutada arvandmete jaoks variatsioonikordajad, eriti näitajate puhul, mis on seotud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemisega. Neid andmeid võib kasutada võrdlusalusena käsiloleva uuringu tulemuste hindamiseks.

▼M8

Katseprotokoll

76. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;

— uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valimise põhjendus, kui kandeaine ei ole vesi.

Katseloomad:

— kasutatud liik/liin;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;

— iga looma kehamass katse alguses;

— liigi valimise põhjendus, kui katseloom ei ole rott.

Katsetingimused:

— annuste valimise põhjendus;

— üksikasjad uuritava kemikaali valmistise / söödavalmistise, saavutatud kontsentratsioonide ning valmistise püsivuse ja homogeensuse kohta;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— vajaduse korral andmed söödas/joogivees sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendamiseks tegelikuks annuseks (mg kehamassi kilogrammi kohta päevas);

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;

— järglaste surmamise korral üksikasjalik kirjeldus surmatavate järglaste juhusliku valimise korra kohta.

Tulemused:

— kehamass / kehamassi muutused;

— vajaduse korral söödatarbimine ja veetarbimine;

▼**M8**

— mürgise mõju andmed kummagi soo ja iga annusemäära kohta, sealhulgas viljakusele ja tiinusele avalduva mõju ning mis tahes muude mürgisusnähtude kohta;

— tiinuse kestus;

— mürgisus või muu mõju paljunemisele, järglastele, sünnijärgsele kasvule jne;

— kliiniliste ilmingute laad, raskusaste ja kestus (nähtude pöörduvus või pöördumatus);

— sensoorse aktiivsuse, haardetugevuse ja motoorse tegevuse hindamise tulemused;

— hematoloogilise analüüsi tulemused koos asjaomaste võrdlusväärtustega;

— kliinilise biokeemilise analüüsi tulemused koos asjaomaste võrdlusväärtustega;

— normaalse või ebanormaalse innatsükliga täiskasvanud emasloomade arv ja tsükli kestus;

— elussündide arv ja pesastumisjärgne kadu;

— silmaga nähtavate kõrvalekalletega järglaste arv; väliste suguelundite makroskoopilise hindamise tulemused, kängunud järglaste arv;

— katse vältel suremise aeg või teave selle kohta, et loomad olid kuni surmamiseni elus;

— pesastunud embrüote arv, pesakonna suurus ja pesakonna kaal mõõtmishetkel;

— järglaste kehamassi andmed;

— iga järglase AGD (ja kehamass AGD mõõtmise päeval);

— nisade esinemine isastel järglastel;

— kilpnäärmehormoonide sisaldus järglastelt 13. päeval võetud proovides ja täiskasvanud isasloomade proovides (ning järglastega emasloomade proovides ja järglastelt 4. päeval võetud proovides, kui seda on mõõdetud);

— andmed järglastega loomade kehamassi kohta surmamise hetkel ning selliste loomade elundite massi kohta;

— lahkamistulemused;

— histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— andmed absorbeerumise kohta (kui on olemas);

— vajaduse korral tulemuste statistilise analüüsi andmed.

Tulemuste arutelu

Järeldused

▼M8

Tulemuste tõlgendamine

77. Kirjeldatud uuring võimaldab hinnata annuste korduval manustamisel tähelda-datavat paljunemisele/arengule avalduvat mürgist mõju. Kuna rõhk on seatud nii üldise mürgisuse kui ka reproduktiiv-/arengutoksilisuse lõppnäitajate hindamisele, võimaldavad uuringu tulemused eelkõige eristada üldise mürgisuse puudumisel paljunemisele/arengule avalduvat mõju sellisest mõjust paljunemisele/arengule, mis avaldub üksnes kontsentratsioonil, mille juures kemikaal on mürgine ka järglaste vanematele (vt punktid 7–11). Saadud tulemused võivad viidata vajadusele teha täiendavaid uuringuid ja võivad hõlbustada järgnevate uuringute kavandamist. Paljunemise ja arenguga seotud tulemuste hõlpsamaks tõlgendamiseks tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga nr 43 (19). Käesoleva katsemeetodi puhul võib olla kasu närilistega tehtavate sisesekretsioonisüsteemi ja paljunemisega seotud katsete tulemuste histoloogilist hindamist käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 106 (16) esitatud teabest (sisesekretsiooni)elundite ja tupeäiete ettevalmistamise ja hindamise kohta.

KIRJANDUS

(1) OECD (1990). Kemikaalide töörühma ja halduskomitee 14. ühiskoosoleku koosolekudokument nr 1. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.

(2) OECD (1992). Ajutise eksperdirühma esimehe aruanne reproduktiivtoksilisust käsitlevate sõeluuringumeetodite alase koosoleku kohta. Tokyo, 27.–29. oktoober 1992. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.

(3) Mitsumori, K., Kodama, Y., Uchida, O., Takada, K., Saito, M., Naito, K., Tanaka, S., Kurokawa, Y., Usami, M., Kawashima, K., Yasuhara, K., Toyoda, K., Onodera, H., Furukawa, F., Takahashi, M., ja Hayashi, Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol. Sci.* 19: 141–149.

(4) Tanaka, S., Kawashima, K., Naito, K., Usami, M., Nakadate, M., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Kurokawa, Y., ja Tobe, M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18: 89–95.

(5) OECD (1998). Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise (EDTA) OECD rakkerühma esimese koosoleku aruanne. 10.–11. märts 1998. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 217. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M8**

(8) Goldman, J. M., Murr, A. S., ja Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res. B* 80(2): 84–97.

(9) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons. Väljaandes: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization. Auston, C. R., ja Short, R. V. (toim.), Cambridge, New York.

(10) Rahvusvaheline kemikaaliohutuse programm (IPCS) (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(11) Moser, V. C., McDaniel, K. M., ja Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.

(12) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., ja Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.

(13) Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., ja MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.

(14) Gallavan, R. H. Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., ja Reynolds, V. L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights. *Reprod. Toxicol.* 13: 383–390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 151. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 106. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(17) Hess, R. A., ja Moore, B. J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Väljaandes: Methods in Reproductive Toxicology. Chapin, R. E., ja Heindel, J. J. (toim.), Academic Press, San Diego, CA. Lk 52–85.

(18) Latendresse, J. R., Warbrittion, A. R., Jonassen, H., ja Creasy, D. M. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. *Toxicol. Pathol*. 30: 524–533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 43. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(20) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No. 150. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M8**

1. liide

MÕISTED (VT KA OECD JUHENDDOKUMENT NR 150 (20))

Androgeensus kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik androgeen (nt testosteroon).

Annus manustatav uuritava kemikaali kogus. Annust väljendatakse uuritava kemikaali kogusena massiühikutes katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas) või kemikaali püsiva kontsentratsioonina söödas.

Annustamine üldmõiste, mis hõlmab annust, selle manustamise sagedust ja annustamise kestust.

Antiandrogeensus kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku androgeeni (nt testosterooni) toimet.

Antitüreoidne aktiivsus kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku kilpnäärmehormooni (nt T_3) toimet.

Antiöstrogeensus kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku östrogeeni (nt 17β-östradiooli) toimet.

Arengutoksilisus reproduktiivtoksilisuse ilming, mis avaldub järglaste sünnieelse, perinataalse või sünnijärgse struktuuri- või funktsioonihäirena.

Emale avalduv mürgisus tiinele emasloomale avalduv kahjulik mõju, mis on spetsiifiline (otsene mõju) või mittespetsiifiline (kaudne mõju) ning on seotud tiinusega.

Ilmne mürgisus üldmõiste, mille abil kirjeldatakse uuritava kemikaali manustamise järel täheldatavaid selgeid mürgisusnähte. Kõnealused nähud peaksid olema ohu hindamiseks piisavad ja sellised, et manustatava annuse suurendamisega kaasnevad eeldatavalt tõsised mürgisusnähud ja tõenäoliselt ka surm.

Kemikaal aine või segu.

NOAEL lühend, millega tähistatakse annusemäära, mille juures ei täheldata kahjulikku toimet. Tegemist on suurima annusega, mis ei põhjusta manustamisest tingitud kahjulikke ilminguid.

Reproduktiivtoksilisus kahjulik mõju järglastele ja/või isas- või emasloomade paljunemisfunktsioonile või paljunemisvõimele.

Türeoidne aktiivsus kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik kilpnäärmehormoon (nt T_3).

Uuritav kemikaal iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideerimine teaduslik protsess, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi rakendamisega seotud nõudeid ja piiranguid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja sobivust konkreetsel eesmärgil kasutamiseks.

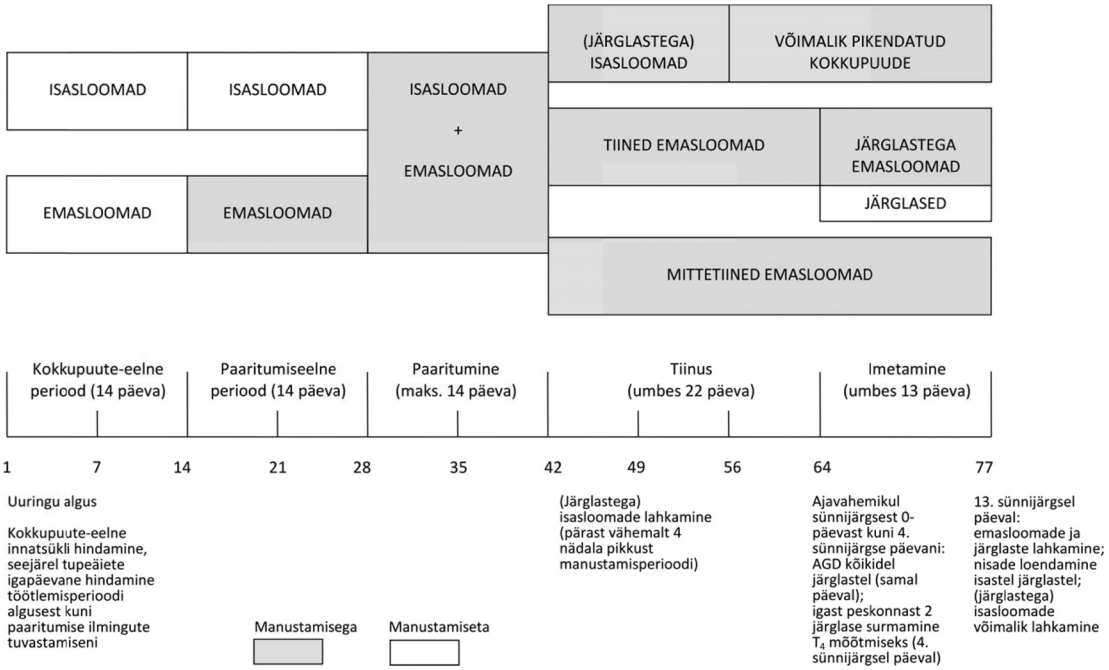
Viljakuse vähenemine isas- või emaslooma paljunemisfunktsiooni häire või paljunemisvõime langus.

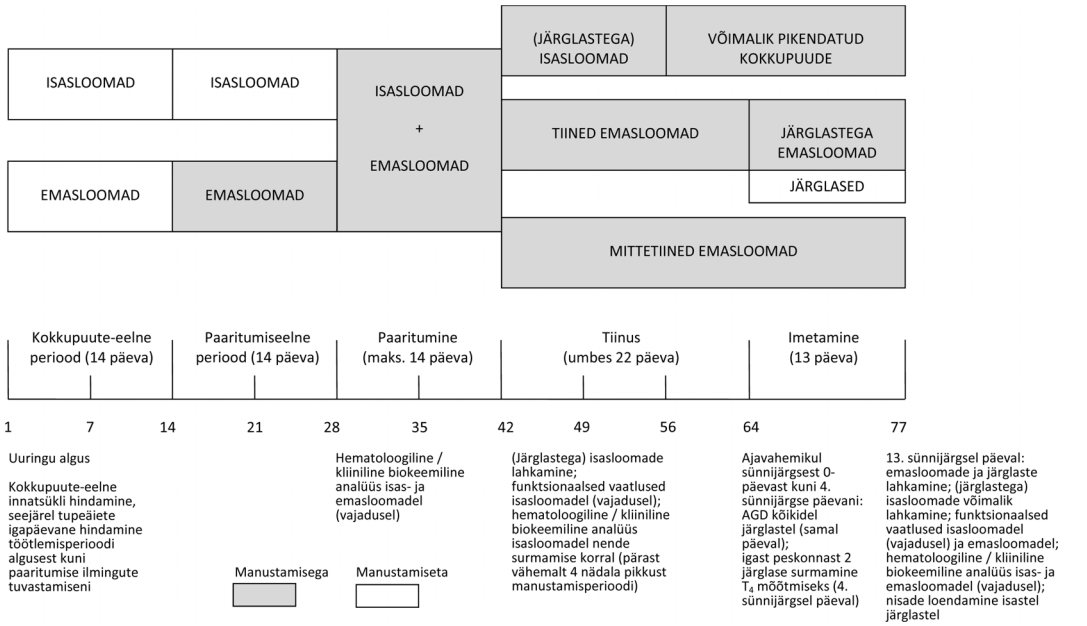
Östrogeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik östrogeen (nt 17β-östradiool).

▼**M8**

2. liide

UURINGU MAKSIMUMKESTUSELE VASTAV TÄISPIKAL 14-PÄEVASEL PAARITUMISPERIOODIL PÕHINEV KATSE SKEMAATILINE AJAKAVA





▼**M8**

3. liide

TABELI KUJUL KOKKUVÕTLIK ARUANNE PALJUNEMISELE/ARENGULE AVALDUVA MÕJU KOHTA

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
Annus (ühik)	0 (kontroll)	…	…	…	…
Paaride arv katse alguses (*N*)					
Innatsükkel (vähemalt keskmine pikkus ja ebaregulaarsete tsüklite esinemissagedus)					
Emasloomad, kellel täheldatakse paaritumise ilminguid (*N*)					
Tiinestunud emasloomad (*N*)					
Eostunud 1.–5. päeval (*N*)					
Eostunud 6.–…. ([1]) päeval (*N*)					
Tiinuse kestus ≤ 21 päeva (*N*)					
Tiinuse kestus 22 päeva (*N*)					
Tiinuse kestus ≥ 23 päeva (*N*)					
Elusalt sündinud järglastega emasloomad (*N*)					
4. sünnijärgse päevani elus püsinud järglastega emasloomad (*N*)					
Pesastunud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta (keskmine)					
Elussündide arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
4. päevani elus püsinud järglaste arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) sünnihetkel (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) 4. päeval (keskmine)					
Pesakonna kaal sünnihetkel (keskmine)					
Pesakonna kaal 4. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass sünnihetkel (keskmine)					
Järglaste kehamass AGD mõõtmise hetkel (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine)					
Järglaste AGD samal sünnijärgsel päeval ajavahemikul sündimispäevast kuni 4. päevani (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine; märkida sünnijärgne mõõtmispäev)					
Järglaste kehamass 4. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass 13. päeval (keskmine)					

▼M8

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
Nisade esinemine isastel järglastel 13. päeval (keskmine)					
KÕRVALEKALLETEGA JÄRGLASED					
Järglastega emasloomad, kellel on 0 kõrvalekalletega järglast					
Järglastega emasloomad, kellel on 1 kõrvalekalletega järglane					
Järglastega emasloomad, kellel on ≥ 2 kõrvalekalletega järglast					
JÄRGLASTE KADU					
Sünnieelne (pesastunud embrüote arvu ja elussündide arvu vahe)					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
≥ 3 järglast kaotanud emasloomad					
Sünnijärgne (elussündide arvu ja 13. sünnijärgse päevani elus püsinud järglaste arvu vahe)					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
≥ 3 järglast kaotanud emasloomad					

([1]) Paaritumisperioodi viimane päev.

▼M8

B.65. *IN VITRO* MEMBRAANIBARJÄÄRI KATSEMEETOD NAHASÖÖVITUSE UURIMISEKS

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435 (2015). Nahasöövitus on Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni (ÜRO) ühtse ülemaailmse kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS (Globally Harmonized System) (1) ning Euroopa Liidu määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus), ([1]) esitatud määratluse kohaselt pöördumatu nahakahjustuse, st marrasknahast pärisnahani ulatuva nähtava nekroosi tekkimine uuritava kemikaali pealekandmise tagajärjel. Käesolev katsemeetod, mis on samaväärne ajakohastatud OECD katsejuhendiga nr 435, on *in vitro* membraanibarjääri katsemeetod, mis saab kasutada söövitavate kemikaalide kindlakstegemiseks. Katsemeetodis kasutatakse tehismembraani, mis on kavandatud söövitavatele kemikaalidele reageerima sarnaselt loomanahale *in situ*.

2. Nahka söövitavat toimet on tavapäraselt hinnatud, kandes uuritavat kemikaali elusloomade nahale ja hinnates nahakahjustuse ulatust pärast kindla perioodi möödumist (2). Peale käesoleva meetodi on söövitavate kemikaalide kindlakstegemiseks kasutatava standardse küüliku *in vivo* nahakatse (käesoleva lisa peatükk B.4, samaväärne OECD katsejuhendiga nr 404) (2) alternatiividena vastu võetud mitu muud *in vitro* katsemeetodit (3, 4). ÜRO GHSi astmelise katsetamise ja hindamise strateegia nahka söövitava toime hindamiseks ja klassifitseerimiseks ning OECD juhenddokumendis nahaärrituse/-söövitusega seotud katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta soovitatakse kasutada valideeritud ja heaks kiidetud *in vitro* katsemeetodeid moodulite 3 ja 4 kohaselt (1, 5). Kõnealuse katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid, kaasa arvatud juhuks, kui saadakse negatiivsed tulemused (5). Selle modulaarse lähenemisviisi korral saab kasutada *in vitro* katsemeetoditega saadud positiivseid tulemusi kemikaali klassifitseerimiseks söövitavana, ilma et oleks vaja täiendavaid loomkatseid; seega vähendatakse ja täiustatakse loomade kasutamist ja välditakse nende kasutamisega kaasneda võivaid valu ja kannatusi.

3. Valideerimisuuringud viidi läbi *in vitro* membraanibarjääri mudeliga, mis on müügil nimega Corrositex® (6, 7, 8) ja millega 163 ainest ja segust koosneva andmebaasi järgi oli kogutäpsus nahka söövitava toime prognoosimisel 79 % (128/163), tundlikkus 85 % (76/89) ning spetsiifilisus 70 % (52/74) (7). Tunnustatud nõuetekohasuse alusel on seda valideeritud võrdlusmeetod (VRM) soovitatav kasutada astmelise katsetamise strateegia osana kemikaalide võimalik nahka söövitava toime hindamisel (5, 7). Enne kui *in vitro* membraanibarjääri mudeliga katsemeetodit nahasöövituse uurimiseks võib kasutada regulatiivsel eesmärgil, tuleb kooskõlas eelnevalt kindlaksmääratud toimivusnõuetega (10) kindlaks teha selle usaldusväärsus, asjakohasus (täpsus) ja selle kavandatud kasutusega seotud piirangud, et tagada selle sarnasus valideeritud võrdlusmeetodiga (9). Andmete vastastikune tunnustamine vastavalt OECD kokkuleppele tagatakse ainult pärast seda,

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353/1, 31.12.2008).

▼M8

kui mis tahes uus või ajakohastatud kavandatud meetod on toimivusnõudeid järgides läbi vaadatud ja lisatud samaväärsesse OECD katsejuhendisse. Praegu on OECD katsejuhendiga nr 435 hõlmatud ainult üks *in vitro* ja käesoleva katsemeetod müügil oleva Corrositex®i mudeliga.

4. Teised katsemeetodid nahka söövitava toime uurimiseks põhinevad rekonstrueeritud inimnaha (OECD katsejuhend nr 431) (3) ja isoleeritud rotinaha kasutamisel (OECD katsejuhend nr 430) (4). Käesoleva katsesuunise järgi saab söövitavaid kemikaali jagada kolme ÜRO GHSi kohasesse söövitavuse alamkategooriatesse ja söövitusohu järgi kolme ÜRO veopakendi rühma. Käesolev katsejuhend võeti esmakordselt vastu 2006. aastal ja seda ajakohastati 2015. aastal, et viidata katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi juhenddokumendile ning ajakohastada pädevuse tõendamise ainete loendit.

MÕISTED

5. Kasutatud mõisted on esitatud liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

6. Selles katsemeetodis kirjeldatud katse-eeskiri võimaldab kvalitatiivselt analüüsida söövitavaid uuritavaid kemikaale ning jagada need ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastesse alamkategooriatesse (tabel 1). Peale selle võib sellist katsemeetodit kasutada otsustamaks konkreetsete kemikaaliklasside, nt orgaaniliste ja anorgaaniliste hapete, happederivaatide ([1]) ja aluste söövitavate ja mittesöövitavate omaduste üle teatavate veokatsete puhul (7, 11, 12). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse valideeritud võrdlusmeetodile (7) sarnanevat üldmetoodikat. See katsemeetod ei anna asjakohast teavet nahaärrituse kohta, seega tuleb märkida, et katsemeetodiga B.46 (samaväärne OECDkatsejuhendiga nr 439) uuritakse spetsiaalselt *in vitro* sellist tervisemõju nagu nahaärritus (13). Nahale pärast ühekordset kokkupuudet avalduva paikse toime täielikuks hindamiseks tuleb juhinduda OECD juhenddokumendist katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (5).

Tabel 1

ÜRO GHSi kohane nahka söövitava aine kategooria ja alamkategooriad ([1])

Söövituskategooria (1. kategooria) (ametiasutustele, kes alamkategooriaid ei kasuta)	Võimalikud söövituse alamkategooriad ([1]) (ametiasutustele, kes kasutavad alamkategooriaid, sealhulgas CLP-määrust)	Söövitav vähemalt ühe looma puhul kolmest	
		Kokkupuuteaeg	Vaatlus
Söövitav	Söövitav, alamkategooria 1A	≤ 3 minutit	≤ 1 tund
	Söövitav, alamkategooria 1B	> 3 minutit / ≤ 1 tund	≤ 14 päeva
	Söövitav, alamkategooria 1C	> 1 tund / ≤ 4 tundi	≤ 14 päeva

([1]) ELis kohaldatakse CLP-määrust, milles on esitatud kolm nahka söövitava aine alamkategooriat: 1A, 1B ja 1C.

7. Valideeritud võrdlusmeetodi (7) puuduseks on asjaolu, et paljud mittesöövitavad kemikaalid ja mõned söövitavad kemikaalid ei tarvitse esialgse sobivuskatse (vt punkt 13 alusel) uurimiseks sobida. Sageli ei sobi uurimiseks

([1]) Happederivaadid ei ole konkreetne klass ning on üldiselt määratletud kui happest kas otseselt, muundamis- või asendusreaktsiooni käigus saadud kemikaal. Sellesse klassi kuuluvad anhüdriidid, halogenohapped, soolad ja muud liiki kemikaalid.

▼M8

kemikaalide vesilahused, mille pH on vahemikus 4,5…8,5; 85 % kõnealuse pH-vahemikuga uuritud kemikaalidest osutusid loomkatsetel mittesöövitavaks (7). *In vitro* membraanibarjääri meetodit võib kasutada tahkete ainete (vees lahustuvad või mittelahustuvad), vedelike (vesilahused või mitte) ja emulsioonide uurimiseks. Kuid uuritavaid kemikaale, mis sobivuskatsel tuvastatavat muutust (nt värvuse muutust valideeritud võrdlusmeetodi kemikaalide detekteerimissüsteemis) esile ei kutsu, ei saa membraanibarjääri meetodiga uurida ning nende uurimiseks tuleks kasutada muid katsemeetodeid.

KATSE PÕHIMÕTE

8. Katsesüsteem koosneb kahest osast: sünteetilisest makromolekulaarsest biobarjäärist ja kemikaalide detekteerimissüsteemist; selle katsemeetodiga tuvastatakse kemikaalide detekteerimissüsteemi abil membraanibarjääri kahjustus, mille on põhjustanud söövitav uuritav kemikaal pärast sünteetilise makromolekulaarse membraanibarjääri pinnale kandmist (7) eeldatavast sama(de) söövitusmehhanismi(de) järgi mis toimivad elusorganismi nahal.

9. Membraanibarjääri läbimist saab mõõta mitme toiminguga või kemikaali detekteerimissüsteemiga, sealhulgas pH indikaatori värvuse muutuse või mõne muu indikaatorlahuse omaduse muutusega barjääri all.

10. Membraanibarjäär peab olema ettenähtud kasutamiseks nõuetekohane, st asjakohane ja usaldusväärne. Muu hulgas peavad olema tagatud preparaatide ühtsed barjääriomadused, st barjääri säilimine mittesöövitavate kemikaalide suhtes ja võimalus liigitada kemikaalid söövitusomaduste järgi erinevatesse ÜRO GHSi söövitavuse alamkategooriatesse (1). Klassifitseerimine põhineb ajal, mis kulub kemikaali läbitungimiseks membraanibarjäärist ja indikaatorlahuseni jõudmiseks.

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

11. Enne käesoleval meetodil põhinevat *in vitro* membraanibarjääri meetodi rutiinset kasutamist tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, klassifitseerides õigesti tabelis 2 soovitatud kaksteist pädevuse kontrolli ainet. Olukorras, kus loetletud aine ei ole kättesaadav, või kui see on põhjendatud, võib kasutada muud ainet (nt võrdluskemikaalide loetelust (10)), mille puhul on kättesaadavad piisavad võrdlusandmed *in vivo* ja *in vitro* katsete kohta, eeldusel, et järgitakse samu valikukriteeriumeid nagu esitatud tabelis 1.

Tabel 2

Pädevuse kontrolli ained ([1])

Aine ([2])	CASi nr	Aineklass	*In vivo* ÜRO GHSi kohane alamkategooria ([3])	*In vitro* ÜRO GHSi kohane alamkategooria ([3])
Boortrifluoriiddihüdraat	13319-75-0	Anorgaanilised happed	1A	1A
Lämmastikhape	7697-37-2	Anorgaanilised happed	1A	1A
Fosforpentakloriid	10026-13-8	Anorgaaniliste hapete prekursorid	1A	1A
Valerüülkloriid	638-29-9	Hapete kloriidid	1B	1B
Naatriumhüdroksiid	1310-73-2	Anorgaanilised alused	1B	1B

▼M8

Aine ([2])	CASi nr	Aineklass	*In vivo* ÜRO GHSi kohane alamkategooria ([3])	*In vitro* ÜRO GHSi kohane alamkategooria ([3])
1-(2-aminoetüül)piperasiin	140-31-8	Alifaatsed amiinid	1B	1B
Benseensulfonüülkloriid	98-09-9	Hapete kloriidid	1C	1C
N,*N*-dimetüülbensüülamiin	103-83-3	Aniliinid	1C	1C
Tetraetüleenpentamiin	112-57-2	Alifaatsed amiinid	1C	1C
Eugenool	97-53-0	Fenoolid	MS	MS
Nonüülakrülaat	2664-55-3	Akrülaadid/ metakrülaadid	MS	MS
Naatriumvesinikkarbonaat	144-55-8	Anorgaanilised soolad	MS	MS

([1]) Eespool loetletud kaheteistkümne aine seas on igast ÜRO GHSi söövitavate ainete alamkategooriast kolm ainet ja kolm mittesöövitavat ainet; kõik ained on kaubanduses kättesaadavad ja ÜRO GHSi alamkategooriasse on nad määratud *in vivo* katsel saadud kvaliteetsete tulemuste alusel. Need ained on võetud loendist, mis sisaldab 40 ainet, mis omakorda kuuluvad miinimumloendisse kemikaalidest, mis on kindlaks määratud struktuurilt ja funktsioonilt valideeritud katsemeetodiga sarnaste katsemeetodite täpsuse ja usaldusväärsuse tõendamiseks, ning valiti 163 võrdluskemikaali seast, mida algselt kasutati võrdlusmeetodi (Corrositex®) valideerimiseks (7, 10, 14). Sellise valimise eesmärk oli, et võimaluste piires oleks valikuga hõlmatud kemikaalid, mis: kutsuvad esile söövitusreaktsiooni kogu vahemikus, mida valideeritud võrdlusmeetodiga on võimalik mõõta või prognoosida (st on mittesöövitavad või kuuluvad ÜRO I, II ja III söövitavate ainete pakendirühma); esindavad samu aineklasse, mida kasutati valideerimisel; on hästi teada oleva keemilise struktuuriga; andsid valideeritud võrdlusmeetodiga korratavaid tulemusi; andsid *in vivo* võrdluskatsel üheselt mõistetavaid tulemusi; on müügil ja mille kõrvaldamine ei ole seotud ülemääraste kuludega (14).

([2]) Uuritavad ained puhtal kujul või puhtusastmega ≥ 90 %.

([3]) ÜRO pakendirühmad I, II ja III vastavad ÜRO GHSi alamkategooriatele 1A, 1B ja 1C. MS: mittesöövitav.

METOODIKA

12. Järgmistes punktides kirjeldatakse söövitavate omaduste hindamiseks kasutatava tehismembraanibarjääri katsemeetodi (7, 15) osi ja metoodikaid, mis põhinevad praegusel valideeritud võrdlusmeetodil, st müügil oleval Corrositex®-iga kasutaval meetodil. Membraanibarjääri, sobivuskatsel kasutatavad ja indikaatorlahused ning lahused, mis võimaldavad klassifitseerimist, võib sünteesida, valmistada või osta, nagu valideeritud võrdlusmeetodi puhul ostetakse Corrositex®. Saadaval on valideeritud katsemeetodi katse-eeskirja näidis (7). Katsed tuleb läbi viia toatemperatuuril (17–25 °C) ja nende osad peavad vastama järgmistele tingimustele.

Uuritava kemikaali sobivuskatse

13. Enne membraanibarjääri katse tegemist tehakse sobivuskatse, et selgitada välja, kas kemikaali detekteerimissüsteem suudab uuritavat kemikaali avastada. Kui kemikaali detekteerimissüsteem uuritavat kemikaali avastada ei suuda, ei sobi membraanibarjääri katsemeetod selle konkreetse uuritava kemikaali võimalike söövitavate omaduste hindamiseks ja selleks tuleks kasutada teistsugust katsemeetodit. Sobivuskatses kasutatav kemikaali detekteerimissüsteem ja valitsevad kokkupuutetingimused peavad imiteerima järgnevas membraanibarjäärikatses toimuvat kokkupuudet.

Uuritava kemikaali ajakategooria katse

14. Kui see on katsemeetodi juures asjakohane, peab sobivuskatse läbinud uuritav kemikaal läbima ka ajakategooria katse, st sõelkatse, millega eristatakse üksteisest nõrgad ja tugevad happed ja alused. Näiteks valideeritud võrdlusmeetodis kasutatakse ajakategooria katset selleks, et teha kindlaks, millist ajavahemikku kahest võimalikust kasutada, võttes aluseks leitud

▼M8

puhvermahtuvuse suuruse. Olenevalt uuritava kemikaali puhvermahtuvusest tuleks söövitavate omaduste ja ÜRO GHSi nahasöövituse alamkategooriate kindlaksmääramisel kasutada kaht erinevat läbimisaja vahemikku.

MEMBRAANIBARJÄÄRI KATSEMEETODI OSAD

Membraanibarjäär

15. Membraanibarjäär koosneb kahest osast: Makromolekulaarne veepõhine valgugeel ja läbitav tugimembraan. Valgugeel peab olema vedelikele ja tahketele ainetele läbitungimatu, kuid see võib muutuda läbitavaks söövitamise tulemusena. Valmis konstrueeritud membraanibarjääri tuleb hoida eelnevalt kindlaksmääratud tingimustes, mis välistavad geeli riknemise, nt kuivamise, mikroobide kasvu, kihistumise, pragunemise vms, mis halvendaks selle toimivust. Tuleb kindlaks määrata vastuvõetav säilitusaeg ja pärast selle möödumist membraanbarjääri preparaate mitte kasutada.

16. Läbitav tugimembraan pakub valgugeelile mehaanilist tuge geelistumise ja uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal. Tugimembraan peaks takistama geeli kortsumist ja nihkumist ning laskma hästi läbi kõiki uuritavaid kemikaale.

17. Valgugeel, mis koosneb näiteks keratiinist, kollageenist või valkude segust, mis moodustavad geelimaatriksi, on uuritava kemikaali sihtobjekt. Valgumaterjal kantakse tugimembraani pinnale ja lastakse enne membraanibarjääri indikaatorlahuse kohale seadmist geelistuda. Valgugeel peab olema läbivalt ühtlase paksuse ja tihedusega, ilma õhumullide ja muude defektideta, mis võiksid mõjutada selle funktsionaalset terviklikkust.

Kemikaalide detekteerimissüsteem

18. Indikaatorlahus, mis on sama mis sobivuskatses kasutatud, peab reageerima uuritava kemikaali olemasolule. Kasutada tuleb värvainest või värvainete segust pH-indikaatorit, nt kresoolpunast või metüüloranži, mis uuritava kemikaali olemasolule reageerides värvi muudavad. Mõõtesüsteem võib olla visuaalne või elektrooniline.

19. Detekteerimissüsteeme, mis on välja töötatud tuvastama uuritava kemikaali läbiminekut membraanibarjäärist, tuleb hinnata asjakohasuse ja usaldusväärsuse seisukohast, et teha kindlaks avastatavate kemikaalide hulk ja kvantitatiivne avastamispiir.

KATSE KÄIK

Katsemeetodi osade kokkupanek

20. Membraanibarjäär paigutatakse indikaatorlahust sisaldavasse viaali (või katseklaasi), nii et tugimembraan on indikaatorlahusega täielikus kontaktis ja õhumulle ei esine. Tuleb olla ettevaatlik, et barjääri terviklikkus säiliks.

▼M8

Uuritava kemikaaliga töötlemine

21. Membraanibarjääri pealmisele pinnale kantakse hoolikalt ühe kihina sobiv kogus (nt 500 µl vedelikku või 500 mg pulbristatud tahket ainet (7)) uuritavat kemikaali ja aetakse ühtlaselt laiali. Iga uuritava kemikaaliga tehakse sobiv hulk paralleelproove, nt neli (7), samuti tehakse paralleelsed kontrollproovid (vt punktid 23–25). Registreeritakse uuritava kemikaali membraanibarjäärile kandmise aeg. Et tagada lühikese söövitusaja täpne registreerimine, ei kanta uuritavat kemikaali paralleelproovidega viaalidesse samaaegselt.

Membraanibarjääri läbimise mõõtmine

22. Iga viaali jälgitakse ning registreeritakse ajahetk, mil indikaatorlahus esmakordselt muutub, st barjäär läbitakse, samuti tehakse kindlaks kemikaali pealekandmisest membraanibarjääri läbimiseni kulunud aeg.

Kontrollproovid

23. Katsetes, kus koos uuritava kemikaaliga kasutatakse kandeainet või lahustit, peab kandeaine või lahusti membraanibarjäärisüsteemiga sobima, st see ei tohi muuta membraanibarjääri süsteemi terviklikkust ega uuritava kemikaali söövitavaid omadusi. Vajaduse korral tuleb uuritava kemikaaliga paralleelselt teha kontrollproov lahusti (või kandeainega), et veenduda lahusti sobivuses membraanibarjäärisüsteemiga.

24. Selleks, et hinnata katsesüsteemi vastuvõetavat toimivust, tehakse uuritava kemikaaliga paralleelselt katse positiivse (söövitava) kontrollprooviga, mille söövitavad omadused on keskmised, nt 110 ± 15 mg naatriumhüdroksiidiga (ÜRO GHSi söövitavate ainete alamkategooria 1B) (7). Söövitava uuritava kemikaali suhtelise söövituspotentsiaali hindamiseks võib kasutada teist positiivset kontrollproovi ainest, mis kuulub uuritava kemikaaliga samasse aineklassi. Positiivsetesse kontrollproovidesse tuleb valida ained, mille söövitavad omadused on keskmise tugevusega (nt ÜRO GHSi alamkategooriasse 1B kuuluvad ained), et avastada muutusi läbitungimisajas, mis võib olla lubamatult pikem või lühem kui kindlaksmääratud võrdlusväärtus, näidates seega, et katsesüsteem ei toimi nõuetekohaselt. Sellisel juhul on vähe kasu äärmiselt söövitavatest (ÜRO GHSi alamkategooria 1A) ja mittesöövitavatest kemikaalidest. Söövitav kemikaal, mis kuulub ÜRO GHSi alamkategooriast 1B, võimaldaks avastada liiga pikka või liiga lühikest läbitungimisaega. Nõrgalt söövitavat ainet (ÜRO GHSi alamkategooria 1C) võib kasutada positiivses kontrollproovis, et mõõta, kui järjepidevalt on katsemeetodiga võimalik eristada nõrgalt söövitavaid ja mittesöövitavaid kemikaale. Olenemata lähenemisviisist tuleks positiivse kontrollproovidega saadud vastuvõetavate tulemuste vahemik välja töötada laboris varem kasutatud positiivsete kontrollproovidega saadud läbitungimisaegade vahemiku (nt keskväärtus ± 2–3 standardhälvet) alusel. Iga uuringu käigus tuleb määrata positiivse kontrollproovi täpne läbitungimisaeg, et tuvastada vastuvõetavast vahemikust väljapoole langevad kõrvalekalded.

25. Paralleelselt uuritava kemikaaliga tuleb teha katse ka negatiivse (mittesöövitava) kontrollprooviga (nt 10 % sidrunhape, 6 % propioonhape (7)), mis on veel üks kvaliteedikontrolli meede membraanibarjääri funktsionaalse terviklikkuse tõendamiseks.

▼M8

Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid

26. Vastavalt iga ÜRO GHSi söövitavate omaduste alamkategooria kohta kindlaksmääratud ajaparameetritele kasutatakse uuritava kemikaali söövitavate omaduste prognoosimiseks uuritava kemikaali membraanibarjäärile kandmisest barjääri läbimiseni kulunud aega (minutites). Et uuringut saaks lugeda nõuetekohaseks, peab paralleelne positiivne kontrollproov andma eeldatava läbitungimisaja (st 8–16 minutit, kui positiivse kontrollainena kasutatakse naatriumhüdroksiidi), paralleelne negatiivne kontrollproov ei tohi olla söövitav ja lahusti kontrollproov, kui seda uuritakse, et tohi olla söövitav ega muuta uuritava kemikaali söövituspotentsiaali. Enne käesoleval katsemeetodil põhineva meetodi rutiinset kasutamist peaksid laborid tõendama oma tehnilist pädevust, kasutades tabelis 2 soovitatud kahtteistkümmet ainet. Niisuguste käesoleva katsemeetodi alusel välja töötatud samalaadsete meetodite puhul, mis on valideeritud võrdlusmeetodiga (14) struktuurilt ja funktsioonilt sarnased, tuleks kasutada eelnevalt kindlaksmääratud toimivusnõudeid, et tõendada uue meetodi usaldusväärsust ja täpsust enne selle kasutamist regulatiivsel eesmärgil (10).

Tulemuste tõlgendamine ja uuritavate kemikaalide klassifitseerimine söövitava toime järgi

27. Uuritava kemikaali membraanibarjäärile kandmisest barjäärist läbitungimiseni kulunud aja (minutites) järgi klassifitseeritakse uuritav kemikaal ÜRO GHSi söövitavate ainete alamkategooriasse (1) ja ÜRO pakendirühma (16), kui see on asjakohane. Iga soovitatava katsemeetodi jaoks tehakse kindlaks läbitungimisaja läviväärtused kõigi kolme söövitavate omaduste alamkategooria puhul. Läbitungimisaja läviväärtuste kohta lõpliku otsuse tegemisel tuleb arvestada vajadust minimeerida söövitusohu alahindamist ja madalamasse kategoorias klassifitseerimist (st valenegatiivseid tulemusi). Praeguse katsejuhendi kohaselt tuleks kasutada Corrositex®-iga kehtivaid läbitungimisaja läviväärtusi, mis on esitatud tabelis 3, sest see on ainus katsemeetod, mis hetkel katsejuhendile vastab (7).

Tabel 3

Corrositex®-i prognoosimismudel

Keskmine läbitungimisaeg (min)		Prognoositav ÜRO GHSi kategooria (3)
1. kategooria uuritav kemikaal (1) (määratud meetodi kategoriseerimiskatse alusel)	2. kategooria uuritav kemikaal (2) (määratud meetodi kategoriseerimiskatse alusel)	
0–3 min	0–3 min	Söövitav võimalik alamkategooria 1A
> 3 kuni 60 min	> 3 kuni 30 min	Söövitav võimalik alamkategooria 1B
> 60 kuni 240 min	> 30 kuni 60 min	Söövitav võimalik alamkategooria 1C
> 240 min	> 60 min	Mittesöövitav

(1) Suure puhvermahtuvusega uuritavad kemikaalid (6)
(2) Väikese puhvermahtuvusega uuritavad kemikaalid (6)
(3) ÜRO GHSi alamkategooriad 1A, 1B ja 1C vastavad ÜRO I, II ja III pakendirühmale

▼M8

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

28. Uuritava kemikaaliga ja positiivse(te) kontrollproovi(de)ga saadud aeg (minutites), mis kulus pealekandmisest barjääri läbimiseni, tuleb esitada tabelina, kus on näidatud nii eraldi andmed iga paralleelproovi kohta kui ka iga katse keskmine tulemus ± standardhälve.

Katseprotokoll

29. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollained

— Ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— tarnija ja partii number, kui see on olemas;

— vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);

— uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;

— säilitustingimused.

Kandeaine

— Identimisandmed, kontsentratsioon (vajaduse korral), kasutatud ruumala;

— kandeaine valimise põhjendus.

Kasutatud in vitro membraanibarjäär ja metoodika, sealhulgas tõendatud täpsus ja usaldusväärsus

Katsetingimused:

— kasutatud aparatuur ja preparaadi ettevalmistusmeetodid;

— kasutatud *in vitro* membraanibarjääri tarnija ja koostis;

— indikaatorlahuse koostis ja omadused;

— avastamismeetod;

— uuritava kemikaali ja kontrollainete kogused;

— paralleelproovide arv;

— ajakategooria katse kirjeldus ja selle valimise põhjendus;

▼**M8**

— pealekandmismeetod;

— vaatluse aeg;

— kasutatud hindamis- ja klassifitseerimiskriteeriumide kirjeldus;

— Katsemeetodi kasutamise pädevuse tõendamine, analüüsides asjaomaseid kemikaale enne meetodi rutiinset kasutamist.

Tulemused

— Iga uuritava ja kontrollprooviga igal paralleelkatsel saadud andmed tabelina;

— muude täheldatud toimete kirjeldus;

— tuletatud klassifikatsioon(id) viitega kasutatud prognoosimudelile ja/või otsustamiskriteeriumidele.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, 5. täiendatud väljaanne, United Nations, New York ja Genf, 2013. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Käesoleva lisa peatükk B.4, „Äge nahaärritus, söövitus“.

(3) Käesoleva lisa peatükk B.40bis, „Nahasöövituskatse *in vitro*: rekonstrueeritud inimese epidermist (RHE) kasutav katsemeetod“.

(4) Käesoleva lisa peatükk B.40, „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmine“.

(5) OECD (2015), „Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation“, Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 203), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. ja Liebsch, M. (1998), „The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team“, *Toxicology In Vitro*, nr 12, lk 483–524.

(7) ICCVAM (1999), „Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM“, NIEHS, NIH Publication (nr 99–4495).

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. ja Maibach H.I. (1994), „Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization“, *Alternative Methods in Toxicology*, nr 10, lk 37–45.

▼**M8**

(9) OECD (2005), „Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, Environmental, Health and Safety Publications, Series on testing and Assessment (nr 34).

(10) OECD (2014), „Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435“, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001), „Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing“, ECVAMi teadusliku nõuandekomitee 15. istungjärk, ISPRA; Itaalia. ATLA nr 29, lk 96–97.

(12) USA Transpordiministeerium (2002), *Exemption DOT-E-10904* (5. täiendatud väljaanne), (20. september 2002), Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Käesoleva lisa peatükk B.46, „Nahasöövituskatse *in vitro*: rekonstrueeritud inimese epidermist (RHE) kasutav katsemeetod“, ICCVAM (2004), „ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion“, NIEHS, NIH Publication (nr 04–4510). Kättesaadav aadressil http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) USA Keskkonnakaitseamet (1996), „Method 1120, Dermal Corrosion“. Kättesaadav aadressil http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013), *UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations*, 18. täiendatud väljaanne (peatükk 2.8), UN, 2013. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼M8

Liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodiga saadud tulemuste ja nõuetekohaste võrdlusväärtuste kokkulangevuse määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks olulistest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (9).

Kemikaal: aine või segu.

Kemikaalide detekteerimissüsteem: visuaalne või elektrooniline mõõtesüsteem indikaatorlahusega, mis reageerib uuritava kemikaali või muude kemikaalide olemasolule või elektrokeemilise reaktsiooni toimumisele nt pH-indikaatorvärvaine või värvainete segu värvuse muutusega.

Vastavus: katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategooriline tulemus, on üks asjakohasuse aspekte. Terminit kasutatakse mõnikord ka täpsuse tähenduses ja määratletakse kõigi nende uuritavate kemikaalide osakaaluna, mis saadud positiivse või negatiivse tulemuse alusel klassifitseeritakse õigesti. Vastavus on tugevas sõltuvuses positiivset tulemust andvate kemikaalide esinemissagedusest uuritavate kemikaalide hulgas (9).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – kemikaalide ühtne ülemaailmne klassifitseerimis- ja märgistamissüsteem): süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (1).

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment – ühtne lähenemisviis katsete tegemisele ja hindamisele.

Segu: kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Ühest koostisosast koosnev aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles ühe peamise koostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Mitme koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles rohkem kui ühe peamise koostisosa kontsentratsioon on $\geq$ 10 % ja $<$ 80 % (massiprotsendid). Mitme koostisosaga aine saadakse tootmisprotsessi käigus. Erinevus segu ja mitme koostisosaga aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosaga aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MS: mittesöövitav

Toimivusnõuded: valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kuivõrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadse meetodiga. See hõlmab järgmist: i) olulisemad katsemeetodi osad; ii) valideeritud katsemeetodi nõuetekohase toimivuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloend ja iii) sarnased usaldusväärsuse ja täpsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (9).

▼**M8**

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat mõju, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist mõju. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi täpsuse (vastavuse) aspekti (9).

Usaldusväärsus: iseloomustab katsemeetodi korratavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline korratavus (9).

Tundlikkus: kõigi positiivsete/reaktsioonivõimeliste kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

Nahasöövitus *in vivo*: naha pöördumatu kahjustuse tekitamine, läbi epidermise pärisnahka (dermasse) ulatuv nähtav nekroos, mis tekib kuni neljatunnisel kokkupuutel katseainega. Tüüpilised söövitusnähud on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

Spetsiifilisus: kõigi niisuguste negatiivsete/mittereageerivate kemikaalide osakaal, mis katsemeetodiga klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

Aine: looduslik või tootmisprotsessi teel saadud keemiline element ja selle ühendid, kaasa arvatud stabiilsuse säilitamiseks vajalikud lisaained ja tootmisprotsessist tingitud lisandid, välja arvatud mis tahes lahusti, mida on võimalik aine stabiilsust vähendamata ja selle koostist muutmata eraldada.

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega ained, komplekssed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid.

▼M8

B.66. **STABIILSE TRANSFEKTSIOONIGA TRANSAKTIVATSIOONI *IN VITRO* KATSEMEETODID, MILLEGA AVASTATAKSE ÖSTROGEENIRETSEPTORITE AGONISTE JA ANTAGONISTE**

ÜLDINE SISSEJUHATUS

OECD toimivusel põhinev katsejuhend

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 455 (2016). Katsejuhend nr 455 on toimivusel põhinev katsejuhend, milles kirjeldatakse stabiilse transfektsiooniga transaktivatsiooni *in vitro* katsemeetodeid östrogeeniretseptorite agonistide ja antagonistide tuvastamiseks (ER TA katsed). See hõlmab mitut teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadset katsemeetodit östrogeeniretseptorite (st ERα, ja/või ERβ) agonistide ja antagonistide kvalitatiivseks määramiseks ning peaks hõlbustama uute samaväärsete või modifitseeritud katsemeetodite väljatöötamist kooskõlas valideerimispõhimõtetega, mis on esitatud OECD juhenddokumendis uute ja ajakohastatud ohu hindamise katsemeetodite valideerimise ja rahvusvahelise tunnustamise kohta (1). Täielikult valideeritud võrdlusmeetodid (liited 2 ja 3), mis on toimivuse põhineva katsejuhendi aluseks, on järgmised:

— stabiilse transfektsiooniga transaktivatsiooni katsemeetod (2), milles kasutatakse rakuliini (h)ERα-HeLa-9903 ning

— VM7Luc ER TA katsemeetod (3), milles kasutatakse rakuliini VM7Luc4E2, ([1]) mis ekspresseerib peamiselt hERα-d ja mõningal määral hERβ-d (4, 5).

Sama ohunäitaja analüüsimiseks kasutatavate samaväärsete katsemeetodite väljatöötamiseks ja valideerimiseks on olemas toimivusnõuded (6, 7) ja neid tuleks kasutada. Need võimaldavad toimivusel põhinevat katsejuhendit nr 455 õigeaegselt muuta, nii et ajakohastatud katsejuhendisse saaks lisada uued samalaadsed katsemeetodid, kuid need lisatakse üksnes pärast seda, kui OECD on need läbi vaadanud ja nõustunud, et toimivusnõuded on täidetud. Selleks, et täita OECD liikmesriikide nõuded östrogeeniretseptorite transaktivatsioonikatse tulemustele, võib kasutada suvalist meetodit katsejuhendiga nr 455 hõlmatud katsemeetoditest, kasutades ühtlasi andmete vastastikust tunnustamist vastavalt OECD kokkuleppele.

Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud meetodite taust ja põhimõtted

2. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja endokriinfunktsiooni potentsiaalselt kahjustava kemikaalid ja neid

([1]) Enne 2016. aasta juuni nimetati see rakuliin rakuliiniks BG1Luc. BG-1 rakke kirjeldasid algselt Geisinger jt (1998) (35) ning hiljem iseloomustasid neid Ameerika Ühendriikide riikliku keskkonnatervise instituudi (National Institute of Environmental Health Sciences – NIEHS) teadlased (36). Suhteliselt hiljuti avastati, et teadlaste kasutatavatel BG-11 rakkudel on olemas kaks varianti, BG-1 Fr ja BG-1 NIEHS. Nende kahe BG-1 rakuliini variandi põhjalik analüüs (sealhulgas DNA uuring), mille viis läbi Li koos kaastöötajatega (2014) (37), näitas, et BG-1 Fr oli unikaalne ja et BG-1 NIEHS, st katsemeetodi väljatöötamiseks kasutatud algne rakuliin, ei olnud BG-1 inimese munasarja kartsinoomi rakuliin, vaid hoopis inimese rinnavähi rakuliini MCF7 variant. Katsemeetodis kasutatud rakuliini, mida algselt nimetati BG1Luc4E2 (38), nimetatakse nüüd VM7Luc4E2 (V – variant; M7 – MCF7 rakud). Samuti nimetatakse katsemeetodit nüüd VM7Luc ER TA katsemeetodiks. Kuigi katsemeetodi aluseks oleva rakuliini päritolu on teine, ei mõjuta see avaldatud valideerimisuuringuid ega käesoleva katsemeetodi kasutamist östrogeense/antiöstrogeense toimega kemikaalide sõelumiseks.

▼**M8**

katsetada. OECD kontseptuaalne raamistik endokriinfunktsiooni potentsiaalselt kahjustavate kemikaalide uurimiseks ja hindamiseks vaadati läbi 2012. aastal. Esialgne ja läbivaadatud kontseptuaalne raamistik on esitatud endokriinseid häireid põhjustavate kemikaalide hindamist käsitlevate standarditud katsejuhendite kohta koostatud OECD juhenddokumendi (8) lisades. Kontseptuaalne raamistik koosneb viiest tasemest, millest igaüks vastab erinevale bioloogilise keerukuse tasemele. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud ERi transaktivatsiooni katsed on 2. tasemel, mis hõlmab „*in vitro* katseid, millega saadakse andmeid teatud kindla(te) endokriinse(te) mehhanismi(de) või raja/-radade kohta.“ See katsemeetod kirjeldab *in vitro* transaktivatsiooni (TA) katseid, mis on välja töötatud östrogeeniretseptorite (ER) agonistide ja antagonistide määramiseks.

3. Östrogeenide vastastiktoime östrogeeniretseptoritega võib mõjutada östrogeenide reguleeritavate geenide transkriptsiooni, mis võib põhjustada rakuprotsesside induktsiooni või pärssimist, kaasa arvatud rakkude paljunemiseks, loote normaalseks arenguks ja reproduktiivfunktsiooni tööks vajalikud protsessid (9, 10, 11). Normaalse östrogeensõltuva süsteemi häirimine võib olla kahjuliku toimega normaalsele arengule (ontogeneesile), reproduktiivtervisele ja reproduktiivsüsteemi terviklikkusele.

4. *In vitro* transaktivatsiooni katsemeetodid põhinevad ainete otsese või kaudse vastastikmõjul konkreetse retseptoriga, mis reguleerib reportergeeni produkti transkriptsiooni. Selliseid katsemeetodeid on laialdaselt kasutatud spetsiifiliste tuumaretseptorite, nt ERide poolt reguleeritud geenikspressiooni hindamiseks (12, 13, 14, 15, 16). Neid on soovitatud kasutada ERi reguleeritava östrogeense transaktivatsiooni tuvastamiseks (17, 18, 19). Tuuma ERidel on olemas vähemalt kaks peamist alatüüpi, α ja β, mida kodeerivad erinevad geenid. Vastavatel valkudel on erinevad bioloogilised funktsioonid, samuti erinev jaotumine kudedes ja erinev ligandisidumisvõime (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26). Tuuma ERα vahendab klassikalist reaktsiooni östrogeenile (27, 28, 29, 30) ning seetõttu on enamik ERi aktiveerimise või inhibeerimise mõõtmiseks hetkel välja töötatavaid mudelid ERα-spetsiifilised. Katsemeetodeid kasutatakse selleks, et välja selgitada kemikaalid, mis aktiveerivad (või pärsivad) ERi pärast ligandi sidumist, misjärel retseptori-ligandi kompleks seondub DNA spetsiifilise vastuselemendiga ja transaktiveerib reportergeeni, mille tulemuseks on markervalgu suurenenud rakusisene ekspressioon. Nendes katsemeetodites võib kasutada erinevate reporterite reaktsioone. Lutsiferaasil põhinevates süsteemides transformeerib ensüüm lutsiferaas substraadilutsiferiini helendavaks bioloogiliseks saaduseks, mida saab kvantitatiivselt mõõta luminomeetriga. Muud näited levinud reporteritest on fluorestseeruv valk ja *lacZ*-geen, mis kodeerib β-galaktosidaasi, ensüümi, mis transformeerib värvitu substraadi X-gal-i (5-bromo-4-kloro-indolüülgalaktopüranosiid) siniseks saaduseks, mida saab kvantitatiivselt mõõta spektrofotomeetriga. Neid reportereid saab kiiresti ja odavalt hinnata müügilolevate katsekomplektidega.

5. STTA ja VM7Luc TA katsemeetodite valideerimisuuringutest nähtub, et need on ettenähtud eesmärgil kasutades asjakohased ja usaldusväärsed (3, 4, 5, 30). Rinna rakuliine kasutavate ja luminestsentsil põhinevate ERi transaktivatsiooni katsemeetodite toimivusnõuded on esitatud ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruandes „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals“ (3). Neid toimivusnõudeid on muudetud, et neid saaks kohaldada nii STTA kui ka VM7Luc TA katsemeetoditele (2).

6. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

▼M8

Transaktivatsiooni katsemeetodite rakendusala ja piirangud

7. Käesolevaid katsemeetodeid on soovitatav kasutada sõelumise ja prioriseerimise eesmärgil, kuid need võivad anda ka niisugust teavet mehhanismide kohta, mida saab kasutada tõendite kaalukust arvestava lähenemisviisi korral. Need katsed uurivad ERiga seondunud kemikaali esilekutsutud transaktsiooni *in vitro* süsteemis. Seega ei tohiks tulemust otse ekstrapoleerida terve *in vivo* endokriinsüsteemi keerukale signaliseerimis- ja reguleerimismehhanismidele.

8. ERide vahendatud transaktsiooni peetakse üheks peamiseks endokriinse häire põhjustamise mehhanismiks, kuigi endokriinne häire võib ilmneda ka muude mehhanismide kaudu, sealhulgas i) vastasmõjud endokriinsüsteemi teiste retseptorite ja ensüümisüsteemidega, ii) hormoonide süntees, iii) hormoonide metaboolne aktiveerimine ja/või inaktiveerimine, iv) hormoonide jaotumine sihtkudedes ja v) hormoonide väljumine organismist. Neid toimemehhanisme ei käsitle ükski käesoleva katsemeetodiga hõlmatud meetod.

9. See katsemeetod uurib kemikaalide võimet ER-sõltuvat transkriptsiooni aktiveerida (st toimida agonistina) ja pärssida (st toimida antagonistina). Mõned kemikaalid võivad olenevalt rakutüübist toimida nii agonisti kui ka antagonistina, olles tuntud kui selektiivsed östrogeeniretseptori modulaatorid (SERMid). Nende katsemeetoditega negatiivse tulemuse andnud kemikaale võiks enne järeldamist, et kemikaal ei seo retseptorit, hinnata ERi sidumise katse abil. Peale selle annavad katsed tõenäoliselt teavet üksnes lähtemolekuli toime kohta, võttes arvesse, et *in vitro* rakusüsteemide metaboliseerimisvõime on piiratud. Arvestades, et valideerimisel kasutati üksnes puhtaid aineid, ei ole rakendatavust uuritavate segude puhul kontrollitud. See katsemeetod on siiski teoreetiliselt kohaldatav mitme koostisosaga ainete, tundmatu või muutuva koostisega ainete ning segude uurimiseks. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine või segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

10. Teavitamise eesmärgil on tabelis 1 esitatud agonistikatse tulemused 34 aine kohta, mille uurimisel kasutati mõlemat käesolevas katsemeetodis kirjeldatud täielikult valideeritud võrdlusmeetodit. Nendest ainetest 26 on liigitatud kindlateks ERi agonistideks ja 8 negatiivseteks, võttes aluseks avaldatud aruanded, sealhulgas *in vitro* ERi sidumise ja transaktivatsiooni katsemeetodite ja/või uterotroofse katsemeetodi kohta (2, 3, 18, 31, 32, 33, 34). Tabelis 2 on esitatud antagonistikatse tulemused 15 aine kohta, mille uurimisel kasutati mõlemat käesolevas katsemeetodis kirjeldatud täielikult valideeritud võrdlusmeetodit. Nendest ainetest 4 on liigitatud kindlateks/eeldatavateks ERi antagonistideks ja 10 negatiivseteks, võttes aluseks avaldatud aruanded, sealhulgas *in vitro* ERi sidumise ja transaktivatsiooni katsemeetodite kohta (2, 3, 18, 31). Tabelites 1 ja 2 esitatud andmete kohaselt langesid kahe võrdlusmeetodiga saadud klassifitseerimise aluseks olevad tulemused 100 % kokku kõigi ainete puhul, välja arvatud ühe aine (mifepristoon) antagonistikatse tulemus, ning kõik ained klassifitseeriti korrektselt ERi agonistiks/antagonistiks või negatiivseks. Lisateave selle kemikaalirühma kohta, samuti muud kemikaalid, mida valideerimisuuringute käigus STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetoditega uuriti, on esitatud 2. liites ER TA toimivusnõuetes (tabelid 1, 2 ja 3) (6, 7).

▼M8

Tabel 1

STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetodite tulemuste ülevaade ainete kohta, mida uuriti mõlema agonistikatsega ja mis klassifitseeriti kas ERi agonistideks (POS) või negatiivseteks (NEG)

	Aine	CASi nr	STTA katsemeetod (1)			VM7Luc ER TA katsemeetod (2)		Klassifitseerimise andmete allikas (4)		
			ER TA toime	PC_{10} väärtus (M)	PC_{50} väärtus (b) (M)	ER TA toime	EC_{50} väärtus (b), (3) (M)	Muud ER TAd (c)	ERi siduv	Uterotroofne
1	17ß-östradiool (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-östradiool (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS (11/11)	POS	POS
3	17α-etinüülöstradiool (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS (22/22)	POS	POS
4	17β-trenboloon	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosteroon (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS (4/4)	POS	POS
6	4-kumüülfenool (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS (5/5)	POS	NT
7	4-*tert*-oktüülfenool (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigeniin (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS (26/26)	POS	NT
9	Atrasiin (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenool A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenool B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS (6/6)	POS	POS
12	Butüülbensüülftalaat (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS (12/14)	POS	NEG

▼M8

	Aine	CASi nr	STTA katsemeetod (1)			VM7Luc ER TA katsemeetod (2)		Klassifitseerimise andmete allikas (4)		
			ER TA toime	PC_{10} väärtus (M)	PC_{50} väärtus (b) (M)	ER TA toime	EC_{50} väärtus (b), (3) (M)	Muud ER TAd (c)	ERi siduv	Uterotroofne
13	Kortikosteroon (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumestrool (a)	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS (30/30)	POS	NT
15	Daidseiin (a)	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS (39/39)	POS	POS
16	Dietüülstilböstrool (a)	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS (42/42)	POS	NT
17	Di-n-butüülftalaat	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS (6/11)	POS	NEG
18	Etüülparabeen	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(PC_{50} puudub)	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Östroon (a)	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS (26/28)	POS	POS
20	Genisteiin (a)	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS (100/102)	POS	POS
21	Haloperidool	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kamferool (a)	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS (23/23)	POS	NT
23	Kepoon (a)	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS (14/18)	POS	NT
24	Ketokonasool	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuroon (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-heksöstrool (a)	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	NT
27	Metüültestosteroon (a)	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS (5/6)	POS	NT

▼M8

	Aine	CASi nr	STTA katsemeetod (1)			VM7Luc ER TA katsemeetod (2)		Klassifitseerimise andmete allikas (4)		
			ER TA toime	PC_{10} väärtus (M)	PC_{50} väärtus (b) (M)	ER TA toime	EC_{50} väärtus (b), (3) (M)	Muud ER TAd (c)	ERi siduv	Uterotroofne
28	Moriin	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	NT
29	Noretünodreel (a)	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	*p,p*'-metoksükloor (a)	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(PC_{50} puudub) (a)	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbitaal (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Reserpiin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolaktoon (a)	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteroon	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	NT

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; M = molaarsus; EC_{50} = 50 % uuritava kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist; NEG = negatiivne; POS = positiivne; NT = ei uuritud; PC_{10} (ja PC_{50}) = uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul toime on 10 % (või PC_{50} korral 50 %) võrreldes positiivse kontrollaine (E2, 1nM) toimega igal plaadil.

(a) STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetoditega uuritud levinuimad ained, mis määrati kas östrogeeniretseptori agonistiks või negatiivseks ja mida kasutati täpsuse hindamiseks VM7Luc ER TA valideerimisuuringus (ICCVAMi VM7Luc ER TA hindamisaruanne, tabel 4-1 (3)).

(b) Kui puudusid tsütotoksilisusest või mittelahustuvusest tingitud piirangud, olid maksimaalsed uuritavad kontsentratsioonid 1×10^{-5} M (STTA katsemeetod) ja 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA katsemeetod).

(c) Sulgudes esitatud number näitab, mitu positiivset (POS) või negatiivset (NEG) uuringutulemust saavutati kõigis viidatud uuringutes kokku.

(1) Väärtused, mis on esitatud östrogeense toime tuvastamiseks kasutatava stabiilse transfektsiooniga transkriptsiooni aktivatsiooni (TA) katsemeetodi (meetod, milles uuritakse inimese östrogeeni α-retseptori vahendatud reportergeeni, kasutades rakuliini hER-HeLa-9903) eelvalideerimise ja laboritevahelise valideerimise esialgses aruandes (2).

(2) ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruanne „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists" (3).

(3) Keskmised EC_{50} väärtused arvutati VM7Luc ER TA katse valideerimisuuringus osalenud laborite (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) esitatud väärtuste alusel (3).

(4) ERi agonistiks või negatiivseks klassifitseerimise aluseks olid ICCVAMi taustaülevaatedokumentides ERi sidumise ja TA katsemeetodite kohta esitatud andmed (31) ning pärast ICCVAMi taustaülevaatedokumentide koostamist avaldatud ja täiendatud publikatsioonidest (2, 3, 18, 31, 33, 34) saadud teave.

Märkused. Kõigi katsemeetodiga hõlmatud meetodite puhul ei tehtud samu mõõtmisi. Mõnel juhul ei ole võimalik EC_{50} arvutada, sest ei ole koostatud annuse-reaktsiooni seose täielikku kõverat. STTA katsemeetodi puhul on PC_{10} väärtus peamiseks mõõdetud väärtuseks, kuid võib leiduda ka muid näiteid PC_x väärtuse abil kasuliku teabe saamisest.

▼M8

Tabel 2

STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetodite tulemuste võrdlus ainete kohta, mida uuriti mõlema antagonistikatsega ja mis klassifitseeriti kas ERi antagonistideks (POS) või negatiivseteks (NEG)

	Aine ([a])	CASi nr	ER STTA katsemeetod ([1])		VM7Luc ER TA katsemeetod ([2])		ER STTA oletatav toime ([4])	ICCVAMi ([5]) konsensusklassifikatsioon	MeSHi ([6]) aineklass	Tooteklass ([7])
			ER TA toime	IC_{50} väärtus ([b]) (M)	ER TA toime	IC_{50} väärtus ([b]), ([3]) (M)				
1	4-hüdroksütamoksüfeen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	Mõõdukalt POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
2	Dibenso[*a*,*h*]antratseen	53-70-3	POS	IC_{50} puudub	POS	IC_{50} puudub	POS	PP	Polütsükliline ühend	Laborikemikaal, looduslik toode
3	Mifepristoon	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	Nõrgalt POS	NEG	Steroid	Ravim
4	Raloksüfeenvesinikkloriid	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	Mõõdukalt POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
5	Tamoksüfeen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
6	17β-östradiool	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Ravim, veterinaarravim

▼M8

	Aine ([a])	CASi nr	ER STTA katsemeetod ([1])		VM7Luc ER TA katsemeetod ([2])		ER STTA oletatav toime ([4])	ICCVAMi ([5]) konsensusklassifikatsioon	MeSHi ([6]) aineklass	Tooteklass ([7])
			ER TA toime	IC_{50} väärtus ([b]) (M)	ER TA toime	IC_{50} väärtus ([b]), ([3]) (M)				
7	Apigeniin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterotsükliline ühend	Värvaine, looduslik toode, ravimite vaheaine
8	Atrasiin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterotsükliline ühend	Herbitsiid
9	Di-n-butüülftalaat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, ftaalhape	Kosmeetikatoodete koostisaine, tööstuskemikaal, plastifikaator
10	Fenarimool	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	pole katsetatud	PN	Heterotsükliline ühend, pürimidiin	Fungitsiid
11	Flavoon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, heterotsükliline ühend	Looduslik toode, ravim
12	Flutamiid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amiid	Ravim, veterinaarravim
13	Genisteiin	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, heterotsükliline ühend	Looduslik toode, ravim

▼M8

	Aine ([a])	CASi nr	ER STTA katsemeetod ([1])		VM7Luc ER TA katsemeetod ([2])		ER STTA oletatav toime ([4])	ICCVAMi ([5]) konsensusklassifikatsioon	MeSHi ([6]) aineklass	Tooteklass ([7])
			ER TA toime	IC_{50} väärtus ([b]) (M)	ER TA toime	IC_{50} väärtus ([b]), ([3]) (M)				
14	*p*-n-nonüülfenool	104-40-5	NEG	—	NEG	—	pole katsetatud	NEG	Fenool	Keemiline vaheühend
15	Resveratrool	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Süsivesinik (tsükliline)	Looduslik toode

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; M = molaarsus; IC_{50} = 50 % uuritava kemikaali suurima inhibeeriva toime avaldumise kontsentratsioonist; NEG = negatiivne; PN = eeldatavasti negatiivne; POS = positiivne; PP = eeldatavasti positiivne.

([a]) STTA ja VM7Luc ER TA katsetemeetoditega uuritud levinuimad ained, mis määrati kas östrogeeniretseptori antagonistiks või negatiivseks ja mida kasutati täpsuse hindamiseks VM7Luc ER TA valideerimisuuringus (2, 3).

([b]) Kui puudusid tsütotoksilisusest või mittelahustuvusest tingitud piirangud, olid maksimaalsed uuritavad kontsentratsioonid 1×10^{-3} M (STTA katsemeetod) ja 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA katsemeetod).

([1]) Östrogeeniretseptori vahendatud toime tuvastamiseks kasutatava stabiilse transfektsiooniga transkriptsiooni aktivatsiooni katsemeetodi valideerimisaruanne, B. osa (2).

([2]) ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruanne „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists" (3).

([3]) Keskmised IC_{50} väärtused arvutati VM7Luc ER TA katse valideerimisuuringus osalenud laborite (XDS, ECVAM, and Hiyoshi) esitatud väärtuste alusel (3).

([4]) ER STTA eeldatav toime CERI östrogeeniretseptori sidumise katsemeetodi kohta aja jooksul kogutud andmete, uterotroofse katse ning avaldatud kirjandusandmetest kogutud teabe põhjal (2).

([5]) ERi antagonistiks või negatiivseks klassifitseerimise aluseks olid ICCVAMi taustaülevaatedokumentides ERi sidumise ja TA katsemeetodite kohta esitatud andmed (31) ning pärast ICCVAMi taustaülevaatedokumentide koostamist avaldatud ja täiendatud publikatsioonidest (2, 3, 18, 31) saadud teave.

([6]) Aineklass on igale ainele omistatud rahvusvaheliselt tunnustatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniraamatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (leitav veebisaidil http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Tooteklass on igale ainele omistatud USA meditsiiniraamatukogu ohtlike ainete andmebaasi (leitav veebisaidil http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB) alusel).

▼M8

ER TA KATSEMEETODI OSAD

Katsemeetodi olulised osad

11. Käesolev katsemeetod kirjeldab katseid, milles kasutatakse stabiilse transfektsiooniga või endogeenseid ERα retseptori ja stabiilse transfektsiooniga reportergeeni konstrukti, mida reguleerib üks või mitu östrogeeni vastuselementi; leiduda võib siiski ka muid retseptoreid, nt ERβ. Need on katsemeetodi olulised osad.

Kontrollproovid

12. Kirjeldada tuleb iga agonisti- ja antagonistikatse paralleelsetes kontrollproovides kasutatavate etalonainete soovituste alust. Asjakohaste paralleelsete kontrollproovide (negatiivne, lahusti ja positiivne) eesmärk on näidata, et katsemeetod katsetingimustes toimib, ning olla eksperimentide omavahelise võrdlemise aluseks; tavaliselt on paralleelsed kontrollproovid osa konkreetse eksperimendi nõuetekohasuse kriteeriumidest (1).

Kvaliteedikontrolli standardkord

13. Kvaliteedikontrolli standardkorda tuleb kirjeldatud viisil järgida iga katse puhul tagamaks, et rakuliin on püsivalt stabiilne mitme passaaži jooksul, ei sisalda mükoplasmat (st ei ole bakteriaalselt saastunud) ja säilitab võime anda aja jooksul oodatavaid ERi vahendatud vastuseid. Lisaks tuleb kontrollida rakuliinide õiget identiteeti, samuti teiste saasteainete (nt seened, pärmseened ja viirused) sisaldust.

Labori pädevuse tõendamine

14. Enne tundmatute kemikaalide uurimist mis tahes selle katsemeetodiga hõlmatud meetodi abil peab iga labor tõendama oma pädevust kõnealuse katsemeetodi kasutamiseks. Pädevuse tõendamiseks peab iga labor viima läbi katsed tabelis 3 loetletud 14 pädevuse tõendamise ainega agonistikatse puhul ja tabelis 4 loetletud 10 pädevuse tõendamise ainega antagonistikatse puhul. Pädevuskatsed kinnitavad ühtlasi katsesüsteemi reageerimisvõimet. Pädevuse tõendamise ainete loetelu on osa võrdlusainete loetelust, mis on esitatud ER TA katsemeetodite toimivusnõuetes (6). Need ained on müügil, esindavad niisuguseid kemikaaliklasse, mida üldiselt seostatakse ER agonistliku või antagonistliku toimega, avaldavad ER agonisti või antagonisti puhul eeldatavat toimet sobivas vahemikus (st on tugevad või nõrgad) ja hõlmavad negatiive. Pädevuse tõendamise ainetega tuleb teha vähemalt kaks korduskatset eri päevadel. Pädevust tõendab iga pädevuse tõendamise aine õige klassifitseerimine (positiivne/negatiivne). Pädevuskatset peaks katsemeetodite õppimise ajal korduvalt tegema iga laboritöötaja. Olenevalt rakutüübist võivad mõned neist pädevuse tõendamise ainetest käituda SERMidena ja toimida nii agonisti kui ka antagonistina. Tabelites 3 ja 4 on pädevuse tõendamise ained siiski klassifitseeritud nende teadaoleva peamise toime järgi, mida tuleks pädevuse tõendamisel arvesse võtta.

15. Tulemuslikkuse tõendamiseks ja kvaliteedi kontrolli eesmärgil peaks iga labor võrdlema aja jooksul agonistide ja antagonistide kohta koostatud andmebaase andmetega etalonaine (nt 17β-östradiool ja tamoksüfeen), positiivses ja negatiivses kontrollproovis kasutatud kemikaalide ning lahusti (nt DMSO) kontrollproovi kohta. Kõigepealt tuleks luua andmebaas vähemalt 10 sõltumatu agonisti (nt 17β-östradiool) ja 10 sõltumatu antagonisti (nt tamoksüfeen) katse andmete põhjal. Kõnealuste etalonainete ja lahusti kontrollproovidega edaspidi saadud tulemused tuleks andmebaasi laiendamiseks sinna lisada; nii tagatakse laboris biokatsemeetodi järjepidevus ja tulemuslikkus läbi aja.

▼M8

Tabel 3

Pädevuse tõendamise ainete (14) loetelu agonistikatse jaoks (1)

Nr (8)	Aine	CASi nr	Eeldatav vastus (2)	STTA katsemeetod			VM7Luc ER TA katsemeetod		MeSHi aineklass (6)	Tooteklass (7)
				PC_{10} väärtus (M) (3)	PC_{50} väärtus (M) (3)	Katsel kasutatud kontsentratsiooni-vahemik (M)	VM7Luc EC_{50} väärtus (M) (4)	Suurim kontsentratsioon vahemikuotsingus (M) (5)		
14	Dietüülstilböstrool	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim, veterinaarravim
12	17α-östradiool	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
15	*meso*-heksöstrool	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Süsivesinik (tsükliline), fenool	Ravim, veterinaarravim
11	4-*tert*-oktüülfenool	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenool	Keemiline vaheühend
9	Genisteiin	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterotsükliline ühend	Looduslik toode, ravim
6	Bisfenool A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenool	Keemiline vaheühend

▼M8

Nr ([8])	Aine	CASi nr	Eeldatav vastus ([2])	STTA katsemeetod			VM7Luc ER TA katsemeetod		MeSHi aineklass ([6])	Tooteklass ([7])
				PC_{10} väärtus (M) ([3])	PC_{50} väärtus (M) ([3])	Katsel kasutatud kontsentratsiooni-vahemik (M)	VM7Luc EC_{50} väärtus (M) ([4])	Suurim kontsentratsioon vahemikuotsingus (M) ([5])		
2	Kamferool	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterotsükliline ühend	Looduslik toode
3	Butüülbensüülftalaat	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karboksüülhape, ester, ftaalhape	Plastifikaator, tööstuskemikaal
4	*p,p*'-metoksükloor	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Süsivesinik (halogeenitud)	Pestitsiid, veterinaarravim
1	Etüülparabeen	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karboksüülhape, fenool	Ravim, konservant
17	Atrasiin	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterotsükliline ühend	Herbitsiid
20	Spironolaktoon	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Laktoon, steroid	Ravim
21	Ketokonasool	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterotsükliline ühend	Ravim

▼M8

Nr ([8])	Aine	CASi nr	Eeldatav vastus ([2])	STTA katsemeetod			VM7Luc ER TA katsemeetod		MeSHi aineklass ([6])	Tooteklass ([7])
				PC_{10} väärtus (M) ([3])	PC_{50} väärtus (M) ([3])	Katsel kasutatud kontsentratsiooni-vahemik (M)	VM7Luc EC_{50} väärtus (M) ([4])	Suurim kontsentratsioon vahemikuotsingus (M) ([5])		
22	Reserpiin	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterotsükliline ühend, indool	Ravim, veterinaarravim

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; EC_{50} = 50 % uuritava kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist; NEG = negatiivne; POS = positiivne; PC_{10} (ja PC_{50}) = uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul toime on 10 % (või PC_{50} korral 50 %) võrreldes positiivse kontrollaine (E2, 1nM) toimega igal plaadil.

([1]) Positiivse või negatiivse ERi antagonistliku toimega ühendiks klassifitseerimise aluseks olid ICCVAMi taustaülevaatedokumentides ERi sidumise ja TA katsemeetodite kohta esitatud andmed (31) ning empiirilised andmed ja muu teave, mis saadi pärast ICCVAMi taustaülevaatedokumentide koostamist avaldatud ja läbivaadatud viidatud uuringutest (2, 3, 18, 31, 32, 33, 34).

([2]) Väärtused, mis on esitatud östrogeense toime tuvastamiseks kasutatava stabiilse transfektsiooniga transkriptsiooni aktivatsiooni (TA) katsemeetodi (meetod, milles uuritakse inimese östrogeeni α-retseptori vahendatud reportergeeni, kasutades rakuliini hER-HeLa-9903) eelvalideerimise ja laboritevahelise valideerimise esialgses aruandes (30).

([3]) Keskmised EC_{50} väärtused arvutati VM7Luc ER TA katse valideerimisuuringus osalenud laborite (XDS, ECVAM, and Hiyoshi) esitatud väärtuste alusel (3).

([4]) Esitatud kontsentratsioonid on suurimad kontsentratsioonid (vahemikuotsing), mida VM7Luc ER TA katsemeetodi valideerimise käigus uuriti. Kui kontsentratsioonid olid eri laborites erinevad, on esitatud suurim kontsentratsioon. Vt tabelit 4-10 ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruandes „ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals" (3).

([5]) Aineklass on igale ainele omistatud rahvusvaheliselt tunnustatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniraamatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (leitav veebisaidil http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Tooteklass on igale ainele omistatud USA meditsiiniraamatukogu ohtlike ainete andmebaasi (leitav veebisaidil http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB) alusel.

([7]) Tabelist 1 (Võrdluskemikaalide loetelu (22) ERi agonistikatse täpsuse hindamiseks) toimivusnõuete juures (6).

([8]) Kui pädevuse tõendamise ainet enam müügil ei ole, võib kasutada samasuguseks klassifitseeritud ning võrreldava võimaliku toime, toimimismehhanismi ja aneklassiga ainet.

▼M8

Tabel 4

Pädevuse tõendamise ainete (10) loetelu antagonistikatse jaoks

	Aine ([a])	CASi nr	ER STTA katsemeetod ([1])			VM7Luc ER TA katsemeetod ([2])			ER STTA ([1]) oletatav mõju	ICCVAMi ([5]) konsensusklassifikatsioon	MeSHi ([6]) aineklass	Tooteklass ([7])
			ER TA toime	IC_{50} (M)	Katsel kasutatud kontsentratsioonivahemik (M)	ER TA toime	IC_{50} ([3]) (M)	Suurim kontsentratsioon vahemikuotsingus (M) ([4])				
1	4-hüdroksütamoksüfeen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	Mõõdukalt POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
2	Raloksüfeenvesinikkloriid	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	Mõõdukalt POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
3	Tamoksüfeen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim
4	17β-östradiool	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	eeldatavalt negatiivne (*)	PN	Steroid	Ravim, veterinaarravim
5	Apigeniin	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterotsükliline ühend	Värvaine, looduslik toode, ravimite vaheaine
6	Di-n-butüülftalaat	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, ftaalhape	Kosmeetikatoodete koostisaine, tööstuskemikaal, plastifikaator

▼M8

	Aine ([a])	CASi nr	ER STTA katsemeetod ([1])			VM7Luc ER TA katsemeetod ([2])			ER STTA ([1]) oletatav mõju	ICCVAMi ([5]) konsensusklas-sifikatsioon	MeSHi ([6]) aineklass	Tooteklass ([7])
			ER TA toime	IC_{50} (M)	Katsel kasutatud kontsentratsioo-nivahemik (M)	ER TA toime	IC_{50} ([3]) (M)	Suurim kontsen-tratsioon vahemikuotsing-us (M) ([4])				
7	Flavoon	525-82-6	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	eeldatavalt negatiivne (*)	PN	Flavonoid, heterot-sükliline ühend	Looduslik toode, ravim
8	Genisteiin	446-72-0	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	eeldatavalt negatiivne (*)	NEG	Flavonoid, heterot-sükliline ühend	Looduslik toode, ravim
9	*p*-n-nonüülfenool	104-40-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	pole katsetatud	NEG	Fenool	Keemiline vaheühend
10	Resveratrool	501-36-0	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	eeldatavalt negatiivne (*)	NEG	Süsivesinik (tsükliline)	Looduslik toode

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; M = molaarsus; IC_{50} = 50 % uuritava kemikaali suurima inhibeeriva toime avaldumise kontsentratsioonist; NEG = negatiivne; PN = eeldatavasti negatiivne; POS = positiivne.

(*) kirjandusandmete järgi klassifitseeritud negatiivseks (2).

([a]) STTA ja VM7Luc ER TA katsetemeetodiga uuritud levinuimad ained, mis määrati kas östrogeeniretseptori antagonistiks või negatiivseks ja mida kasutati täpsuse hindamiseks VM7Luc ER TA valideerimisuuringus (2, 3).

([1]) Östrogeeniretseptori vahendatud toime tuvastamiseks kasutatava stabiilse transfektsiooniga transkriptsiooni aktivatsiooni katsemeetodi valideerimisaruanne, B. osa (2).

([2]) ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruanne „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists" (3).

([3]) Keskmised IC_{50} väärtused arvutati VM7Luc ER TA katse valideerimisuuringus osalenud laborite (XDS, ECVAM, and Hiyoshi) esitatud väärtuste alusel (3).

([4]) Esitatud kontsentratsioonid on suurimad kontsentratsioonid (vahemikuotsing), mida VM7Luc ER TA katsemeetodi valideerimise käigus uuriti. Kui kontsentratsioonid olid eri laborites erinevad, on esitatud suurim kontsentratsioon. Vt tabelit 4-11 ICCVAMi katsemeetodi hindamisaruandes „ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals" (3).

([5]) ERi antagonistiks või negatiivseks klassifitseerimise aluseks olid ICCVAMi taustaülevaatedokumentides ERi sidumise ja TA katsemeetodite kohta esitatud andmed (31) ning pärast ICCVAMi taustaülevaatedokumentide koostamist avaldatud ja täiendatud publikatsioonidest (2, 3, 18, 31) saadud teave.

([6]) Aineklass on igale ainele omistatud rahvusvaheliselt tunnustatud standardse klassifitseerimisskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniraamatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (leitav veebisaidil http// www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Tooteklass on igale ainele omistatud USA meditsiiniraamatukogu ohtlike ainete andmebaasi (leitav veebisaidil http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB) alusel.

▼M8

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

16. Katse nõuetekohaseks tunnistamise või tagasilükkamise aluseks on iga katse tegemisel kasutatud etalonaine ja kontrollproovidega saadud tulemuste hinnang. Etalonainete PC_{50} (EC_{50}) või IC_{50} väärtused peaksid vastama valitud katsemeetodi (vt 2. liide STTA kohta ja 3. liide VM7Luc ER TA kohta) nõuetekohasuse kriteeriumidele ning kõik positiivsed/negatiivsed kontrollproovid peaksid igas nõuetekohaseks tunnistatud katses olema õigesti klassifitseeritud. Katse järjepideva läbiviimise võimet tuleb tõendada aja jooksul etalonainete ja kontrollproovide kohta kogutud andmeid sisaldava andmebaasi arendamise ja hooldamisega (vt punkt 15). Laborisisese korratavuse mõõduna võib kasutada mitme katsega saadud etalonainete kõverate ja parameetrite sobitamise tulemusel leitud keskväärtuste standardhälbeid (SD) või variatsioonikordajaid (CV). Peale selle peavad seoses nõuetekohasuse kriteeriumidega olema täidetud järgmised tingimused:

— andmed peavad olema ERi aktiveerimise (agonistikatse) või pärssimise (antagonistikatse) (st tõhususe ja toime) kvantitatiivseks hindamiseks piisavad;

— piisava tundlikkuse tagamiseks peab reporteri keskmine aktiivsus võrdlusöstrogeeni võrdluskontsentratsiooni puhul olema võrdne vähemalt kandeaine (lahusti) kontrollproovi analüüsil määratud miinimumiga. STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetodite korral on see igal plaadil neljakordne kandeaine kontrollprooviga saadud keskmine;

— uuritavad kontsentratsioonid peaksid jääma uuritavate kemikaalide lahustuvusvahemikku ega tohiks olla tsütotoksilised.

Andmeanalüüs

17. Positiivse ja negatiivse vastuse klassifitseerimiseks tuleks iga katsemeetodi puhul järgida kindlaksmääratud andmete tõlgendamise eeskirja.

18. Nõuetekohasuse kriteeriumide (punkt 16) täitmine näitab, et katsemeetod toimib korrektselt, kuid see ei taga täpsete andmete saamist mis tahes konkreetsel katsel. Esimese katse tulemuste kordumine on parim märk täpsete andmete saamisest. Kui kahe katsega saadakse korratavad tulemused (st mõlema katse tulemused näitavad, et uuritav kemikaal on positiivne), ei ole kolmanda katse tegemine vajalik.

19. Kui kahe katsega saadud tulemused ei ole korratavad (nt uuritav kemikaal on ühe katse põhjal positiivne ja teise põhjal negatiivne) või kõnealuse katsemeetodi tulemuste puhul on nõutav suurem paikapidavuse aste, tuleks läbi viia vähemalt kolm sõltumatut katset. Sellisel juhul võetakse klassifitseerimisel aluseks kaks kokkulangevat tulemust kolmest.

Andmete tõlgendamise üldkriteeriumid

20. Praegu ei ole olemas üldtunnustatud meetodit ER TA andmete tõlgendamiseks. Kuid nii ERi vahendatud toime kvalitatiivne (nt positiivne/negatiivne) kui ka kvantitatiivne (nt EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) hindamine peab põhinema empiiriliste andmetel ja põhjendatud teaduslikel otsustel. Positiivseid tulemusi tuleks võimaluse korral iseloomustada nii toime suurusjärgu poolest kandeaine (lahusti) kontrollproovi või etalonöstrogeeniga võrreldes kui ka toime avaldumise kontsentratsiooni (nt EC_{50}, PC_{50}, RPC_{max}, IC_{50} jms) poolest.

▼M8

Katseprotokoll

21. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Katsemeetod:

— kasutatud katsemeetod;

— kontrollaine, etalonaine, uuritav kemikaal;

— tarnija, partii number, aegumise kuupäev, kui olemas;

— uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja stabiilsus lahustis, kui teada;

— vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist.

Ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Lahusti/kandeaine:

— iseloomustus (omadused, tarnija ja partii);

— lahusti/kandeaine valiku põhjendus;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines, kui teada.

Rakud:

— rakkude tüüp ja päritolu:

  • kas ERi ekspresseeritakse endogeenselt? Kui ei, siis milline/millised retseptor(id) transfekteeriti?

  • kasutatud reporterikonstrukt(id) (sealhulgas päritoluliigid);

  • transfektsioonimeetod;

  • stabiilse transfektsiooni säilitamiseks kasutatud selekteerimismeetod (kui asjakohane);

  • kas transfektsioonimeetod on stabiilsete liinide puhul asjakohane?

— rakupassaažide arv (sulatamisest alates);

▼**M8**

— rakupassaažide arv sulatamisel;

— rakukultuuride säilitamise meetodid.

Katsetingimused:

— lahustuvusest tingitud piirangud;

— eluvõimelisuse hindamiseks kasutatud meetodite kirjeldus;

— söötme koostis, CO_2 kontsentratsioon;

— uuritava kemikaali kontsentratsioonid;

— kandeaine ja lisatud uuritava kemikaali kogus;

— inkubeerimise temperatuur ja niiskus;

— töötluse kestus;

— rakutiheduse töötluse alguses ja selle ajal;

— positiivsed ja negatiivsed etalonained;

— reporterreagendid (toote nimetus, tarnija ja partii);

— kriteeriumid, mille alusel katsetulemused liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Nõuetekohasuse kontroll:

— kordne induktsioon iga analüüsitava plaadi puhul ja kas need vastavad katses nõutavatele miinimumnõuetele, mille aluseks on aja jooksul kontrollproovidega saadud tulemused;

— nõuetekohasuse kriteeriumide, nt $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ tegelikud väärtused ja Hilli kõvera tõusu väärtused paralleelselt uuritud positiivsete kontrollainete / etalonainete korral.

Tulemused

— toor- ja normaliseeritud andmed;

— maksimaalne kordse induktsiooni tase;

— tsütotoksilisuse andmed;

— vähim toimet avaldav kontsentratsioon, kui see on olemas;

— RPC_{Max}, PCmax, PC_{50}, IC_{50} ja/või EC_{50} väärtused, vajaduse korral;

— võimaluse korral andmed vastuse sõltuvuse kohta kontsentratsioonist;

▼**M8**

— statistiline analüüs, kui see on olemas, koos mõõtevea ja usalduspiiridega (nt aritmeetilise keskmise standardviga, standardhälve, variatsioonikordaja või usaldusvahemik usaldusnivool 95 %) ning kirjeldus selle kohta, kuidas need väärtused saadi.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) OECD (2005), „Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 34), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(2) OECD (2015), „Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 225), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(3) ICCVAM (2011), „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists“, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol, P. *et al.* (1998), „Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis“, *Cancer. Res.*, nr 58(23), lk 5367–73.

(5) Rogers, J. M. ja Denison, M. S. (2000), „Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals“, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, nr 13(1), lk 67–82.

(6) OECD (2012), „Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455)“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 173), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(7) OECD (2015), „Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists“ Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 174), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(8) OECD (2012), „Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 150), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(9) Cavailles, V. (2002), „Estrogens and Receptors: an Evolving Concept“, *Climacteric*, nr 5, 2 lisa, lk 20–6.

(10) Welboren, W. J. *et al.* (2009), „Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated?“, *Endocr. Relat. Cancer*, nr 16(4), lk 1073–89.

(11) Younes, M. ja Honma, N. (2011), „Estrogen Receptor Beta“, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, nr 135(1), lk 63–6.

▼**M8**

(12) Jefferson, W.N. *et al.* (2002), „Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses“, *Journal of Chromatography B*, nr 777(1–2), lk 179–189.

(13) Sonneveld, E. *et al.* (2006), „Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities“, *Toxicol. Sci.*, nr 89(1), lk 173–187.

(14) Takeyoshi, M. *et al.* (2002), „The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions“, *Toxicology Letters*, nr 126(2), lk 91–98.

(15) Combes, R. D. (2000), „Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans“, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, nr 28(1), lk 81–118.

(16) Escande, A. *et al.* (2006), „Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta“, *Biochem. Pharmacol.*, nr 71(10), lk 1459–69.

(17) Gray, L.E. Jr. (1998), „Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens“, *Toxicol. Lett.*, nr 102–103, lk 677–680.

(18) EDSTAC (1998), „Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report“.

(19) ICCVAM (2003), „ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays“.

(20) Gustafsson, J. Ö. (1999), „Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action“, *Journal of Endocrinology*, nr 163(3), lk 379–383.

(21) Ogawa, S. *et al.* (1998), „The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro*“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, nr 243 (1), lk 122–126.

(22) Enmark, E. *et al.* (1997), „Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern“, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, nr 82(12), lk 4258–4265.

(23) Ball, L. J. *et al.* (2009), „Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements“, *Molecular and Cellular Endocrinology*, nr 299(2), lk 204–211.

(24) Barkhem, T. *et al.* (1998), „Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists“, *Mol. Pharmacol.*, nr 54(1), lk 105–12.

(25) Deroo, B. J. ja Buensuceso, A. V. (2010), „Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies“, *Molecular Endocrinology*, nr 24(9), lk 1703–1714.

(26) Harris, D. M. *et al.* (2005), „Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells“, *Experimental Biology and Medicine*, nr 230(8), lk 558–568.

(27) Anderson, J. N., Clark, J. H. ja Peck, E. J. Jr. (1972), „The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, nr 48(6), lk 1460–1468.

▼**M8**

(28) Toft, D. (1972), „The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA“, *Journal of Steroid Biochemistry*, nr 3(3): lk 515–522.

(29) Gorski, J. *et al.* (1968), „Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus“, *Recent Progress in Hormone Research*, nr 24, lk 45–80.

(30) Jensen, E. V. *et al.* (1967), „Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues“, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, nr 56(3), lk 547–569.

(31) ICCVAM (2002), „Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay“, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno, J. *et al.* (2001), „The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1“, *Environ. Health Persp.*, nr 109, lk 785–94.

(33) Kanno, J. *et al.* (2003), „The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies“, *Environ. Health Persp.*, nr 111, lk 1530–1549.

(34) Kanno, J. *et al.* (2003), „The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies“, *Environ. Health Persp.*, nr 111, lk 1550–1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989), „Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors“, *Cancer*, nr 63, lk 280–288.

(36) Baldwin *et al.* (1998), „BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*“, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, nr 34, lk 649–654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014), „Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant“, *Mol. Endo.*, nr 28, lk 2072–2081.

(38) Rogers, J. M. ja Denison, M. S. (2000), „Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals“, *In Vitro & Molec. Toxicol.* nr 13, lk 67–82.

▼M8

1. liide

MÕISTED JA LÜHENDID

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid: katse kontrollproovide ja etalonainete toimivuse miinimumnõuded. Selleks, et katse loetaks kehtivaks, peavad kõik nõuetekohasuse kriteeriumid olema täidetud.

Täpsus (vastavus): katsemeetodiga saadud tulemuste ja nõuetekohaste võrdlusväärtuste kokkulangevuse määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks olulistest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (1).

Agonist: aine, mis konkreetse retseptoriga seondudes põhjustab vastuse, nt transkriptsiooni.

Antagonist: retseptori ligandi või kemikaali liik, mis retseptoriga seondudes ei kutsu esile bioloogilist vastust, vaid blokeerib või summutab agonisti vahendatud vastuseid.

Antiöstrogeenne toime: kemikaali võime pärssida 17β-östradiooli toimet, mida vahendatakse östrogeeniretseptorite kaudu.

Raku morfoloogia: koekultuuri plaadi süvendis monokihis kasvanud rakkude kuju ja välimus. Surevate rakkude morfoloogia on sageli ebatavaline.

CF: OECD kontseptuaalne raamistik endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks ja hindamiseks.

Töötlemine aktiivsöe/dekstraaniga: rakukultuuris kasutatud seerumi töötlemine. Aktiivsöe/dekstraaniga töötlemise teel eemaldatakse endogeensed hormoonid ja hormoone siduvad valgud.

Kemikaal: aine või segu.

Tsütotoksilisus: kahjulik mõju raku struktuurile või funktsioonile, mis lõpuks võib põhjustada raku surma ning mida kajastab pärast kokkupuuteperioodi lõppemist süvendis leiduvate rakkude arvu vähenemine või rakufunktsiooni mõõtnäitajate vähenemine paralleelselt uuritud kandeaine kontrollprooviga võrreldes.

CV: variatsioonikordaja.

DCC-FBS: dekstraaniga kaetud aktiivsöega töödeldud veiselooteseerum.

DMEM: Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde.

DMSO: dimetüülsulfoksiid.

E2: 17β-östradiool.

EC50: 50 % uuritava kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist.

ED: endokriinsed häired.

hERα: inimese östrogeeni alfa-retseptor.

▼**M8**

hERß: inimese östrogeeni beeta-retseptor.

EFM: östrogeenivaba sööde. Dulbecco modifitseeritud Eagle'i minimaalsööde (DMEM), millele on lisatud 4,5 % aktiivsöe/dekstraaniga töödeldud veiseloote-seerumit, 1,9 % L-glutamiini ja 0,9 % Pen-Strepi.

ER: östrogeeniretseptor.

ERE: östrogeeni vastuselement.

Östrogeenne toime: kemikaali võime matkida 17β-östradiooli, sidudes östrogee-niretseptoreid ja neid aktiveerides. hERα vahendatud östrogeenset toimet saab tuvastada käesoleva katsemeetodiga.

ERTA: östrogeeniretseptori transaktivatsioon.

FBS: veiselooteseerum.

HeLa: inimese emakakaelarakkude surematu liin.

HeLa9903: HeLa raku subkloon, millesse on stabiilselt transfekteeritud hERαα ja lutsiferaasi reportergeen.

IC_{50}: 50 % uuritava pärssiva kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alter-native Methods.

Laboritevaheline korratavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse eelvalideerimise ja valideerimise käigus ning see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (1).

Laborisisene korratavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada eri aegadel samasuguseid tulemusi (1).

LEC: vähim toimet avaldav kontsentratsioon on uuritava kemikaali vähim kont-sentratsioon, mis kutsub esile vastuse (st uuritava kemikaali vähim kontsentrat-sioon, mille juures kordne induktsioon on paralleelselt uuritud kandeaine kont-rollproovi omaga võrreldes statistiliselt erinev).

Samalaadne katsemeetod: katsemeetod, mis on struktuurilt ja funktsioonilt sarnane valideeritud ja tunnustatud võrdlusmeetodiga. Nimetatakse ka samaväär-seks katsemeetodiks.

MT: metallotioneiin.

MMTV: hiire piimanäärmekasvaja viirus.

OHT: 4-hüdroksütamoksüfeen.

PBTG: toimivusel põhinev katsejuhend.

▼**M8**

PC (positiivne kontrollproov): väga aktiivne aine, eelistatavalt 17ß-östradiool, mida uuritakse kõigis katsetes, et tagada katsemeetodi nõuetekohane toimivus.

PC_{10}: uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures agonistikatses mõõdetud toime on 10 % maksimaalsest toimest, mida positiivne kontrollproov (STTA katsemeetodi korral E2 kontsentratsiooniga 1 nM) igal plaadil esile kutsub.

PC_{50}: uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures agonistikatses mõõdetud toime on 50 % maksimaalsest toimest, mida positiivne kontrollproov (E2 katsemeetodis täpsustatud võrdluskontsentratsioonis) igal plaadil esile kutsub.

PC_{max}: uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis kutsub esile maksimaalse vastuse.

Toimivusnõuded: valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kuivõrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadse meetodiga. Sealhulgas on 1) katsemeetodi olulised osad, 2) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja 3) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel (1).

Pädevuse tõendamise ained: toimivusnõuetes sisalduvas alamloetelus esitatud võrdlusained, mida laborid võivad kasutada, et tõendada oma tehnilist pädevust standardse katsemeetodi kasutamiseks. Nende ainete tüüpilised valikukriteeriumid on, et need esindaks laia vastusevahemikku, oleksid müügil ja et nende kohta oleksid kättesaadavad kvaliteetsed võrdlusandmed.

Pädevus: enne tundmatute ainete uurimist tõendatud võime katsemeetodit korrektselt kasutada.

Võrdlusöstrogeen (positiivne kontrollaine): 17β-östradiool (E2, CAS 50-28-2).

Etalonaine: võrdlusaine, mida kasutatakse katsemeetodi sobivuse tõendamiseks. STTA ja VM7Luc ER TA katsemeetodite puhul on etalonaineks 17β-östradiool.

Valideeritud katsemeetodid: katsemeetodid, millel põhineb toimivusel põhinev katsejuhend nr 455.

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat mõju, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist mõju. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi täpsuse (vastavuse) aspekti (1).

Usaldusväärsus: iseloomustab katsemeetodi korratavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamisel arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline korratavus.

RLU: suhteline valgusühik.

RNA: ribonukleiinhape.

RPC_{max}: uuritava kemikaali indutseeritud maksimaalne vastus, väljendatuna protsendina 1 nM E2 indutseeritud vastusest samal plaadil.

▼M8

RPMI: sööde RPMI-1 640, millele on lisatud 0,9 % Pen-Strepi ja 8,0 % veiselooteseerumit (FBS).

Katse: üksikeksperiment, millega hinnatakse kemikaali mõju bioloogilise analüüsi tulemustele. Iga katse on tervikeksperiment, mis viiakse läbi paralleelsüvendites rakkudega, mis on külvatud ühisest rakukogumist ühel ja samal ajal.

Sõltumatu katse: eraldiseisev sõltumatu eksperiment, millega hinnatakse kemikaali mõju bioloogilise analüüsi tulemustele, kasutades teisest rakukogumist pärit rakke ja värskelt valmistatud kemikaalilahuseid; katse võib läbi viia erineval päeval või võib seda samal päeval teha teine töötaja.

SD: standardhälve.

Tundlikkus: kõigi niisuguste positiivsete/aktiivsete ainete osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (1).

Spetsiifilisus: kõigi niisuguste negatiivsete/mitteaktiivsete ainete osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (1).

Stabiilne transfektsioon: kui DNA transfekteeritakse kultiveeritud rakkudesse nii, et see integreerub stabiilselt rakkude genoomi, mille tulemusena toimub transfekteeritud geenide stabiilne ekspressioon. Stabiilselt transfekteeritud rakkude kloonid valitakse välja stabiilsete markerite järgi (nt G418-resistentsus).

STTA katsemeetod: stabiilse transfektsiooniga transaktivatsiooni katse, ERα transkriptsiooni aktivatsiooni katse, milles kasutatakse rakuliini HeLa 9 903.

Uuring: kogu katsetega seotud töö, mis on tehtud, et hinnata üht konkreetset ainet, kasutades konkreetset katsemeetodit. Uuring koosneb etappidest, mis hõlmavad kasutatavas uuritava aine söötmes lahustuvuse uurimist, eelkatseid vahemiku leidmiseks, kõiki vajalikke tervikkatseid kokku, andmeanalüüsi, kvaliteedi tagamist, tsütotoksilisuse hindamist jms. Uuringu lõpuleviimine võimaldab klassifitseerida uuritava kemikaali toimet (st, kas on aktiivne, mitteaktiivne või ei anna ühest tulemust) uuritava toksilise omaduse seisukohast, mida kasutava katsemeetodi abil hinnatakse, ja hinnata mõju tugevust positiivse võrdluskemikaaliga võrreldes.

Aine: REACH-määruses ([1]) on aine määratletud kui looduslik või tootmisprotsessi teel saadud keemiline element või selle ühendid koos stabiilsuse säilitamiseks vajalike ja tootmisprotsessist johtuvate lisanditega, välja arvatud lahustid, mida on võimalik ainest eraldada, mõjutamata aine stabiilsust või muutmata selle koostist. ÜRO GHSis (1) on kasutatud väga sarnast määratlust.

TA (transaktivatsioon): mRNA sünteesi alustamine vastusena keemilisele signaalile, näiteks östrogeeni seondumisele östrogeeniretseptoriga.

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 18. detsembri 2006. aasta määrus (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ. ELT L 304, 22.11.2007, lk 1.

▼M8

Katsemeetod: siinses kontekstis on katsemeetod üks metoodikatest, mis on tunnistatud valiidseks, sest see vastab väljatöötatud toimivuskriteeriumidele. Katsemeetodi osad hõlmavad näiteks konkreetset rakuliini koos sellega seotud kasvutingimustega, konkreetset söödet, milles katse läbi viiakse, plaadi ettevalmistamise tingimusi, uuritavate kemikaalide valimist ja lahjendamist, samuti mis tahes muid nõutavaid kvaliteedikontrolli meetmeid ja meetodiga seotud andmehindamisetappe.

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Transkriptsioon: mRNA süntees.

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega kemikaal, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Valideeritud katsemeetod: katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul (1).

Valideerimine: protsess, millega tehakse kindlaks konkreetse lähenemisviisi, meetodi, analüüsi, protsessi või hindamisviisi usaldusväärsus ja asjakohasus seoses määratud eesmärgiga (1).

VC (kandeaine kontrollproov): uuritavate ja kontrollkemikaalide lahustamiseks kasutatavat lahustit uuritakse eraldi kui kandeainet, mis ei sisalda lahustatud kemikaali.

VM7: immortaliseeritud adenokartsinoomirakk, mis ekspresseerib endogeenselt östrogeeniretseptorit.

VM7Luc4E2: rakuliin VM7Luc4E2 aretati inimese immortaliseeritud VM7 adenokartsinoomirakkudest, mis ekspresseerivad endogeenselt mõlemat liiki östrogeeniretseptorit (ERα ja ERβ) ning millesse on stabiilselt transfekteeritud plasmiid pGudLuc7.ERE. Kõnealune plasmiid sisaldab nelja sünteetilise oligonukleotiidi koopiat, milles östrogeeni vastuselement jääb ülespoole hiire piimanäärmekasvaja viiruse promootorist ja jaanimardika lutsiferaasi geenist.

Nõrgalt positiivne kontrollaine: võrdluskemikaalide loetelust valitud nõrgalt aktiivne aine, mida uuritakse kõigis katsetes, et tagada katsemeetodi nõuetekohane toimivus.

▼**M8**

2. liide

STABIILSE TRANSFEKTSIOONIGA INIMESE ÖSTROGEENI A-RETSEPTORI TRANSAKTIVATSIOONI (TA) KATSEMEETOD, MILLES UURITAKSE KEMIKAALIDE TOIMET ÖSTROGEENI AGONISTI VÕI ANTAGONISTINA, KASUTADES RAKULIINI HERA-HELA-9903

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

1. Transaktivatsiooni (TA) katsemeetodis kasutatakse rakuliini hERα-HeLa-9 903, et tuvastada toime östrogeeni agonistina, mida vahendab inimese östrogeeni α-retseptor (hERα). Stabiilse transfektsiooniga transaktivatsiooni (STTA) katsemeetodi valideerimisuuring, mille tegi Jaapani kemikaalide hindamise ja uurimise instituut (CERI), kasutades inimese östrogeeni α-retseptori vahendatava östrogeeni agonistliku ja antagonistliku toime tuvastamiseks rakuliini hERα-HeLa-9 903, tõendas katsemeetodi asjakohasust ja usaldusväärsust ettenähtud eesmärgil kasutades (1).

2. See katsemeetod on välja töötatud spetsiaalselt hERα-vahendatud transaktivatsiooni tuvastamiseks, kasutades mõõdetava parameetrina kemoluminestsentsi. Kuid üle 1 μM fütoöstrogeeni kontsentratsioonide juures on teadaolevalt saadud luminestsentssignaali, mida ei vahenda retseptorid, vaid mida põhjustab lutsiferaasi reportergeeni üleaktiveerimine (2, 3). Kuigi annuse-vastuse kõver näitab, et ERi süsteemi aktiveerumine toimub väiksematel kontsentratsioonidel, tuleb stabiilse transfektsiooniga ER TA katsesüsteemides hoolitalt uurida suurtel kontsentratsioonidel ilmnevat lutsiferaasi ekspressiooni, mida põhjustavad fütoöstrogeenid või samalaadsed ühendid, mis sarnaselt fütoöstrogeenile tekitavad lutsiferaasi reportergeeni üleaktivatsiooni (1. liide).

3. Enne käesoleva katsemeetodi regulatiivsel eesmärgil kasutamist tuleks lugeda peatükke „Üldine sissejuhatus“ ja „ER TA katsemeetodi osad“. Käesolevas katsejuhendis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud liites 2.1.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

4. Katsemeetodit kasutatakse selleks, et tuvastada östrogeeniretseptori seondumist ligandiga. Ligandi seondumise järel translokeerub retseptori-ligandi kompleks tuuma, kus seondub DNA spetsiifiliste vastuselementidega ja transaktiveerib jaanimardika lutsiferaasi reportergeeni, mille tulemusena suureneb ensüüm lutsiferaasi ekspressioon rakus. Lutsiferiin on substraat, mille ensüüm lutsiferaas transformeerib bioluminestsentsiga, mida saab luminomeetriga kvantitatiivselt mõõta. Lutsiferaasi aktiivsust saab kiiresti ja odavalt hinnata paljude müügilolevate katsekomplektidega.

5. Katsesüsteemi kasutatakse rakuliini hERα-HeLa-9 903, mis on saadud inimese emakakaelakasvajast ja millele on stabiilselt lisatud kaks konstrukti: i) hERαα ekspressiooni konstrukt (kodeerib inimese täispikkusega retseptorit) ja ii) jaanimardika lutsiferaasi reporterkonstrukt, milles on viis vitellogeniini östrogeeni vastuselemendi (ERE) tandemkordust, mida juhib hiire metallotioneiini (MT) promootori TATA-element. Hiire MT TATA geenikonstrukt on osutunud kõige paremini toimivaks ja seetõttu seda enamasti kasutatakse. Sellest tulenevalt saab selle hERα-HeLa-9 903 rakuliiniga mõõta uuritava kemikaali võimet indutseerida lutsiferaasi geeni ekspressiooni hERα-vahendatud transaktivatsiooni.

▼M8

6. ERi agonistikatse korral oleneb andmete tõlgendamine sellest, kas uuritava kemikaali indutseeritud maksimaalse vastuse tase on suurem või võrdne 10 %-ga positiivse kontrollaine (PC) 17β-östradiooli (E2) maksimaalselt indutseeriva kontsentratsiooniga (1 nM) indutseeritud vastuse tasemest (st PC_{10}-ga). ERi antagonistikatse korral oleneb andmete tõlgendamine sellest, kas vastuse toime on vähemalt 30 % väiksem kui vastus, mille indutseeris mittetsütotoksiline kontrollproov, kuhu oli lisatud võrdlusainet (25 pM E2). Andmete analüüsimist ja tõlgendamist on üksikasjalikult kirjeldatud punktides 34–48.

METOODIKA

Rakuliinid

7. Katsemeetodiga tuleks kasutada stabiilse transfektsiooniga hERα-HeLa-9 903 rakuliini. Seda rakuliini saab osta Jaapani teadusbioressursside kogu (Japanese Collection of Research Bioresources, JCRB) rakupangast ([1]) materjali üleandmise lepingu (Material Transfer Agreement, MTA) allakirjutamisel.

8. Katsete tegemisel tohib kasutada üksnes mükoplasmavabu rakke. Mükoplasmainfektsiooni tuvastamiseks on sobiv tundlik meetod RT-PCR-meetod (polümeraasiahela reaktsioon reaalajas) (4, 5, 6).

Rakuliini stabiilsus

9. Rakuliini stabiilsuse jälgimiseks tuleks agonistikatse korral kasutada etalonainetena E2, 17α-östradiooli, 17α-metüültestosterooni ja kortikosterooni ning kontrollida kogu kontsentratsiooni-vastuse kõverat tabelis 1 esitatud uuritavate kontsentratsioonide vahemikus vähemalt üks kord iga kord, kui katsemeetodit kasutatakse; tulemused peavad langema kokku tabelis 1 esitatud tulemustega.

10. Antagonistikatse korral tuleks iga katsega paralleelselt kontrollida kahe etalonaine, tamoksüfeeni ja flutamiidi täielikke kontsentratsioonikõveraid. Jälgida tuleb nende kahe kemikaali korrektset positiivseks või negatiivseks klassifitseerimist.

Rakkude kasvatamine ja plaadile kandmise tingimused

11. Rakke tuleb hoida ilma fenoolpunaseta Eagle'i essentsiaalses minimaalsöötmes (EMEM), millele on lisatud 60 mg/l of antibiootikumi kanamütsiini ja 10 % dekstraankattega aktiivsöega töödeldud veiselooteseerumit (DCC-FBS), in a CO2-inkubaatoris (5 % CO2) temperatuuril 37±1 °C. 75–90 % konfluentsuse saavutamisel võib rakud ümber külvata, lisades 100 mm Petri tassi 10 ml rakukultuuri tihedusega 0,4 × 105 – 1 × 105 rakku/ml. Rakud suspendeeritakse 10 % FBS-EMEMiga (sama mis DCC-FBSiga EMEM) ning külvatakse mikroplaadi süvenditesse tihedusega 1×10^4 rakku/(100 µl × süvend). Järgmiseks inkubeeritakse rakke 5 % CO_2 inkubaatoris temperatuuril 37±1 °C kolme tunni jooksul enne kemikaaliga kokku puutumist. Plasttarvikud ei tohi ilmutada östrogeenset toimet.

12. Vastuse usaldusväärsuse säilitamiseks tuleks rakke kasvatada külmutatud varudest konditsioneeritud söötmes rohkem kui ühe passaaži võrra, kuid mitte üle 40 passaaži. hERα-HeLa-9 903 rakuliini puhul kestab see alla kolme kuu. Rakkude toimivus võib väheneda, kui neid kasvatatakse ebasobivates kasvutingimustes.

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan. Faks: +81-72-641-9812

▼M8

13. DCC-FBSi võib valmistada liites 2.2 esitatud kirjelduse järgi või hankida kaubandusest.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

ERi agonistikatses kasutatavad positiivsed ja negatiivsed etalonained

14. Enne uuringut ja selle ajal tuleb kontrollida katsesüsteemi reageerimisvõimet, kasutades asjakohastes kontsentratsioonides tugevat östrogeeni (E2), nõrka östrogeeni (17α-östradiooli), väga nõrka agonisti (17α-metüültestosterooni) ja negatiivset ainet (kortikosterooni). Valideerimisuuringus (1) leitud vastuvõetava vahemiku väärtused on esitatud tabelis 1. Nende nelja etalonaine paralleelproovid tuleb lisada igasse katsesse ning saadud tulemused peavad jääma antud vastuvõetavatesse piiridesse. Kui see nii ei ole, siis tuleb kindlaks teha nõuetekohasuse kriteeriumidele mittevastavuse põhjus (kontrollida nt rakkude käitlemist, seerumi ja antibiootikumi kvaliteeti ja kontsentratsiooni) ning analüüsi korrata. Kui nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, on äärmiselt oluline rakkude kasvatamise materjalide ühtlane kasutamine, et tagada EC_{50}, PC_{50} ja PC_{10} väärtuste minimaalne varieeruvus. Nelja etalonaine paralleelproovidega,mis lisatakse igasse katsesse (uuritakse samades tingimustes, sealhulgas samade materjalide, rakupassaažide arvu ja tehnikutega), saab kontrollida analüüsi tundlikkust, sest kolme positiivse etalonaine PC_{10} väärtused peaksid jääma vastuvõetavatesse piiridesse, samuti ka PC_{50} ja EC_{50} väärtused, kui neid on võimalik arvutada (vt tabelit 1).

Tabel 1

ERi agonistikatses kasutatava nelja etalonaine vastuvõetava vahemiku väärtused

Nimetus	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logPC_{50}$	Hilli kõvera tõus	Uuritav vahemik
17β-östradiool (E2) CASi nr: 50-28-2	–11,4 ~ –10,1	< –11	–11,3 ~ –10,1	0,7 ~ 1,5	10^{-14} ~ 10^{-8} M
17α-östradiool CASi nr: 57-91-0	–9,6 ~ –8,1	–10,7 ~ –9,3	–9,6 ~ –8,4	0,9 ~ 2,0	10^{-12} ~ 10^{-6} M
Kortikosteroon CASi nr: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10} ~ 10^{-4} M
17α-metüültestosteroon CASi nr: 58-18-4	–6,0 ~ –5,1	–8,0 ± –6,2	—	—	10^{-11} ~ 10^{-5} M

ERi antagonistikatses kasutatavad positiivsed ja negatiivsed etalonained

15. Enne uuringut ja selle ajal tuleb kontrollida katsesüsteemi reageerimisvõimet, kasutades asjakohastes kontsentratsioonides positiivset ainet (tamoksüfeeni) ja negatiivset ainet (flutamiidi). Valideerimisuuringus (1) leitud vastuvõetava vahemiku väärtused on esitatud tabelis 2. Nende kahe etalonaine paralleelproovid tuleb lisada igasse katsesse ning saadud tulemused hinnata õigeks vastavalt kriteeriumidele. Kui seda teha ei saa, siis tuleb kindlaks teha kriteeriumidele mittevastavuse põhjus (kontrollida nt rakkude käitlemist, seerumi ja antibiootikumi kvaliteeti ja kontsentratsiooni) ning analüüsi korrata. Peale selle tuleb arvutada positiivse aine (tamoksüfeeni) IC_{50} väärtused ning tulemused peavad jääma esitatud vastuvõetavatesse piiridesse. Kui nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, on äärmiselt oluline rakkude kasvatamise materjalide ühtlane kasutamine, et tagada IC50 väärtuste minimaalne varieeruvus. Kahe etalonaine paralleelproovidega, mis lisatakse igasse katsesse (uuritakse samades tingimustes, sealhulgas samade materjalide, rakupassaažide arvu ja tehnikutega), saab kontrollida analüüsi tundlikkust (vt tabelit 2).

▼M8

Tabel 2

ERi antagonistikatses kasutatava kahe etalonaine kriteeriumid ja vastuvõetava vahemiku väärtused

Nimetus	Kriteeriumid	$LogIC_{50}$	Uuritav vahemik
Tamoksüfeen CASi nr: 10 540-29-1	Positiivne: arvutada tuleb IC_{50}	–5,942 ~ –7,596	10^{-10} ~ 10^{-5} M
Flutamiid CASi nr: 13 311-84-7	Negatiivne: IC_{30} ei pea arvutama	—	10^{-10} ~ 10^{-5} M

Positiivne kontrollproov ja kandeaine kontrollproov

16. ERi agonistikatses kasutatavast positiivsest kontrollainest (1 nM E2) ja ERi antagonistikatses kasutatavast positiivsest kontrollainest (10 μM TAM) tuleb igale plaadile lisada vähemalt kolm paralleelproovi. Uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatavast kandeainest tuleb igale plaadile lisada vähemalt kolm paralleelproovi. Kui positiivse kontrollaine lahustamiseks kasutatakse muud kandeainet, kui seda, milles lahustatakse uuritav kemikaal, tuleb positiivsete kontrollproovidega samale plaadile lisada kolm paralleelproovi ka teisest kandeainest.

ERi agonistikatse kvaliteedi kriteeriumid

17. Positiivse kontrollainega (1 nM E2) saavutatud lutsiferaasi keskmine aktiivsuse peab olema vähemalt neljakordne igal plaadil kandeaine kontrollprooviga saavutatud keskmisega võrreldes. See kriteerium on kindlaks määratud valideerimisuuringus leitud näitajate väärtustega (aja jooksul mõõdetud 4- kuni 30-kordsed).

18. Katsemeetodi kvaliteedikontrolli seisukohast peaks positiivse kontrollproovi (1 nM E2) PC10 väärtusele vastav kordne induktsioon olema suurem kui 1+2 SD kandeaine kontrollproovi kordse induktsiooni väärtusest (= 1). Prioriseerimise eesmärgil võib PC10 väärtus olla kasulik andmete vajalik analüüsimise hõlbustamiseks statistilise analüüsiga võrreldes. Kuigi statistiline analüüs annab teavet olulisuse kohta, ei ole niisugune analüüs kvantitatiivne parameeter kontsentratsioonil põhineva võimaliku toime puhul ega ole seega prioriseerimise seisukohast nii kasulik.

ERi antagonistikatse kvaliteedi kriteeriumid

19. Kontrollproovi lisatud ainega (25 pM E2) saavutatud lutsiferaasi keskmine aktiivsuse peab olema vähemalt neljakordne igal plaadil kandeaine kontrollprooviga saavutatud keskmisega võrreldes. See kriteerium on kindlaks määratud valideerimisuuringus leitud näitajate väärtustega.

20. Katsemeetodi kvaliteedikontrolli seisukohast peaks 1 nM E2 suhteline transkriptsiooni aktivatsioon (RTA) olema üle 100 %, 1 μM 4-hüdroksütamoksüfeeni (OHT) RTA alla 40,6 % ja 100 μM digitoniini (Dig) RTA alla 0 %.

Labori pädevuse tõendamine (vt käesoleva katsemeetodi jaotise „ER TA katsemeetodi osad“ punkti 14 ning tabeleid 3 ja 4).

Kandeaine

21. Kandeaine kontrollprooviks tuleks kasutada dimetüülsulfoksiidi (DMSO) või asjakohast lahustit samas kontsentratsiooni, nagu seda kasutatakse erinevates positiivsetes ja negatiivsetes kontrollproovides ja uuritavate kemikaalide proovides. Uuritavad kemikaalid tuleb lahustada lahustis, milles nad lahustuvad ja mis on võimeline segunema rakkude söötmega. Sobivad kandeained on vesi, etanool (puhtusega 95–100 %) ja DMSO. Kui kasutatakse DMSOd, ei tohi selle kontsentratsioon ületada 0,1 mahuprotsenti. Mis tahes kandeaine korral tuleb tõendada, et maksimaalne kasutatav kogus ei ole tsütotoksiline ega sega analüüsimeetodi toimivust.

▼M8

Uuritavate kemikaalide ettevalmistamine

22. Üldiselt tuleks kemikaalid lahustada DMSOs või muus sobivas lahustis ning seejärel lahjendada sama lahustiga tavapärases vahekorras 1: 10, et saada lahused söötmega lahjendamiseks.

Lahustuvus ja tsütotoksilisus: vahemiku leidmise kaalutlused

23. Uuritava kemikaali sobiva kontsentratsioonivahemiku määramiseks ning kontrollimiseks, kas uuritava kemikaali puhul võib tekkida probleeme lahustuvuse või tsütotoksilisusega, tuleb teha eelkatse. Kõigepealt uuritakse kemikaale maksimaalse kontsentratsiooniga kuni 1 µl/ml, 1 mg/ml või 1 mM olenevalt sellest, milline on väikseim. Olenevalt eelkatse täheldatud tsütotoksilisuse ulatusest või lahustuvuse puudumisest uuritakse esimeses põhikatses kemikaali 10-kordsete lahjenduste seerias alates maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM, 100 µM, 10 µM jne) ning dokumenteeritakse täheldatav hägusus, sade või tsütotoksilisus. Teises ja vajaduse korral ka kolmandas katses tuleks kontsentratsioone sobivalt kohandada, nii et oleks võimalik paremini iseloomustada kontsentratsiooni-vastuse kõverat ning vältida kontsentratsioone, mille juures lahustuvus puudus või mis indutseerisid liigset tsütotoksilisust.

24. ERi agonistide ja antagonistide korral võib suurenenud tsütotoksilisus tüüpilist sigmoidset vastust oluliselt moonutada või summutada ning seda tuleks andmete tõlgendamisel arvesse võtta. Kasutada tuleks tsütotoksilisuse uurimismeetodeid, millega on võimalik saada teavet 80 % rakkude eluvõimelisuse kohta, kasutades labori kogemuste põhinevat asjakohast katset.

25. Kui tsütotoksilisuse katse tulemus näitab, et uuritava kemikaali kontsentratsioon on rakkude arvu vähendanud 20 % või rohkem, tuleb see kontsentratsioon lugeda tsütotoksiliseks ning tsütotoksilise kontsentratsiooni lähedased ja sellest kõrgemad kontsentratsioonid tuleb hindamisest välja jätta.

Kemikaaliga kokkupuude ja analüüsiplaadi jaotus

26. Kemikaali lahjendamise (1. ja 2. etapp) ning rakkudega kokkupuute (3. etapp) saab läbi viia järgmiselt.

1. etapp: igast uuritavast kemikaalist tehakse DMSO või sobiva lahustiga lahjenduste seeria ning lisatakse need mikroplaadi süvenditesse, et saada vahemiku leidmise eelkatses määratud lõplik lahjenduste seeria (tavaliselt on seerias nt kontsentratsioonid 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM ja 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)) kolme paralleelprooviga.

2. etapp: kemikaali lahjendamine: kõigepealt lahjendada 1,5 µl uuritavat kemikaali lahust nii, et saadakse 500 µl söödet.

3. etapp: rakkude kokkupuude kemikaaliga: lisada 50 µl söötmes lahust (valmistati 2. etapis) analüüsisüvendis, mis sisaldab 10^4 rakku/100 µl/süvend.

Igas süvendis on söötme soovitatav lõplik ruumala 150 µl. Uuritavad proovid ja etalonained võib paigutada nii, nagu näidatud tabelites 3 ja 4.

▼**M8**

Tabel 3

Etalonainete eri kontsentratsioonidega proovide mikroplaadile paigutamise näide ERi agonistikatse puhul.

Rida	17α-metüültestosteroon			Kortikosteroon			17α-östradiool			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konts. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	Konts. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konts. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Konts. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konts. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konts. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konts. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kandeaine kontrollproov (0,1 % DMSO); PC: positiivne kontrollproov (1 nM E2)

27. Etalonaineid (E2, 17α-östradiool, 17α-metüültestosteroon ja kortikosteroon) tuleb analüüsida iga katse käigus (tabel 3). Igal uuritaval plaadil peavad olema süvendid positiivse kontrollprooviga (1 nM E2), mis on võimeline esile kutsuma E2 maksimaalse vastuse, ja kandeaine kontrollprooviga (DMSO või sobiv lahusti). Kui sama katse käigus kasutatakse eri allikatest pärit rakke (nt erineva passaažide arvuga, eri partiidest pärit vms), tuleb etalonaineid analüüsida iga päritoluga rakkudega.

Tabel 4

Eri kontsentratsioonidega uuritava kemikaali ja kontrollproovide mikroplaadile paigutamise näide ERi agonistikatse puhul.

Rida	Uuritav kemikaal 1			Uuritav kemikaal 2			Uuritav kemikaal 3			Uuritav kemikaal 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konts. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	Konts. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konts. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Rida	Uuritav kemikaal 1			Uuritav kemikaal 2			Uuritav kemikaal 3			Uuritav kemikaal 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	Konts. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konts. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konts. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konts. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kandeaine kontrollproov (0,1 % DMSO); PC: positiivne kontrollproov (1 nM E2)

Tabel 5

Etalonainete eri kontsentratsioonidega proovide mikroplaadile paigutamise näide ERi antagonistikatse puhul

Rida	Tamoksüfeen			Flutamiid			Uuritav kemikaal 1			Uuritav kemikaal 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**Konts. 1 (10 µM)**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→
B	**Konts. 2 (1 µM)**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→
C	**Konts. 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**Konts. 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**Konts. 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**Konts. 6 (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1 % DMSO**	→	→	→	→	→	**1 µM OHT**	→	→	**100 µM Dig**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**PC**	→	→	→	→	→

VC: kandeaine kontrollproov (0,1 % DMSO); PC: positiivne kontrollproov (1 nM E2); OHT: 4-hüdroksütamoksüfeen; Dig: digitoniin.

= lisatud on 25 pM E2

28. Selleks, et hinnata kemikaalide antagonistlikku toimet, tuleb ridades A kuni G olevatesse süvenditesse lisada 25 pM E2. Etalonaineid (tamoksüfeen ja flutamiid) tuleb analüüsida iga katse käigus. Igal katses analüüsitaval plaadil peaks olema positiivsete kontrollproovidega süvendid (töödeldud 1 nM E2ga, millega saab kontrollida hERα-HeLa-9 903 rakuliini kvaliteeti), kandeaine kontrollproovidega süvendid (töödeldud DMSO või sobiva lahustiga), 0,1 % DMSOga süvendid, kuhu lisatakse veel E2 (rikastatud kontrollproov), lõplikus kontsentratsioonis 1 µM OHTga töödeldud süvendid ja 100 µM digitoniiniga töödeldud süvendid (tabel 5). Järgmisel analüüsitaval plaadil peaks olema sama paigutus ilma etalonaineteta (tabel 6). Kui sama katse käigus kasutatakse eri allikatest pärit rakke (nt erineva passaažide arvuga, eri partiidest pärit vms), tuleb etalonaineid analüüsida iga päritoluga rakkudega.

▼M8

Tabel 6

Eri kontsentratsioonidega uuritava kemikaali ja kontrollproovide mikroplaadile paigutamise näide ERi antagonistikatse puhul

Rida	Uuritav kemikaal 1			Uuritav kemikaal 2			Uuritav kemikaal 3			Uuritav kemikaal 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konts. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	Konts. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	Konts. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Konts. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Konts. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Konts. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kandeaine kontrollproov (0,1 % DMSO); PC: positiivne kontrollproov (1 nM E2); OHT: 4-hüdroksütamoksüfeen; Dig: digitoniin.

: lisatud on 25 pM E2

29. Vajadust mööda tuleb kinnitada ääreefektide puudumist, kuid kui on ääreefektide kahtlus, tuleks plaadi paigutust muuta nii, et neid efekte saaks vältida. Näiteks võib proovide paigutamisel plaadile äärmised süvendid kasutamata jätta.

30. Pärast kemikaalide lisamist inkubeeritakse analüüsitavaid plaate 5 % CO_2 inkubaatoris temperatuuril 37±1 °C 20–24 tunni jooksul, et indutseerida reportergeeni produkte.

31. Väga lenduvate ühendite korral tuleb rakendada eritingimusi. Sellisel juhul võivad lähedalasuvate süvendites kontrollproovid anda valepositiivseid tulemusi, mida tuleb eeldatavate ja aja jooksul kogutud kontrollväärtuse puhul arvesse võtta. Mõnel juhul, kui lenduvus võib olla probleemiks, võib kasutada kilekatteid, mis tõhusalt eraldavad üksikud süvendid katse läbiviimise ajaks ja mille kasutamine on seetõttu sellistel juhtudel soovitatav.

32. Sõltumatuse tagamiseks tuleb sama kemikaaliga korduskatsed läbi viia eri päevadel.

Lutsiferaasi mõõtmine

33. Kui nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, võib mõõtmiseks kasutada müügilolevat lutsiferaasi analüüsireagenti [nt Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, või samaväärne)] või standardset lutsiferaasi analüüsisüsteemi (nt Promega, E1500 või samaväärne). Analüüsireagendid tuleb valida kasutatava luminomeetri tundlikkusest lähtuvalt. Standardset lutsiferaasi analüüsisüsteemi kasutades tuleks enne substraadi lisamist kasutada rakukultuuri lüüsimise reagenti (nt Promega, E1531 või samaväärne). Lutsiferaasi analüüsireagenti tuleb kasutada vastavalt tootja juhistele.

ANDMEANALÜÜS

ERi agonistikatse

34. ERi agonistikatse korral tuleb positiivse kontrollaine (1 nM E2) suhtelise transkriptsiooni aktiivsuse leidmiseks analüüsida sama plaadi luminestsentssignaale, järgides järgmisi etappe (ka muud matemaatilised võtted on lubatud):

1. etapp. Arvutada kandeaine kontrollproovi keskväärtus.

▼M8

2. etapp. Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine kontrollproovi keskväärtus iga süvendi puhul saadud väärtusest.

3. etapp. Arvutada normaliseeritud positiivse kontrollproovi keskväärtus.

4. etapp. Jagada plaadi iga süvendi normaliseeritud väärtus normaliseeritud positiivse kontrollproovi keskväärtusega (PC = 100 %).

Viimane iga süvendi kohta saadu väärtus on kõnealuse süvendi suhteline transkriptsiooni aktiivsus positiivse kontrollproovi vastusega võrreldes.

5. etapp. Arvutada uuritava kemikaali iga kontsentratsioonirühma suhteliste transkriptsiooni aktiivsuste keskväärtus. Vastusega on seotud kaks mõõdet: keskmine transkriptsiooni aktiivsus (vastus) ja kontsentratsioon, mille juures vastus ilmneb (vt järgmist jaotist).

Kaalutlused EC_{50}, PC_{50} ja PC_{10} induktsiooni kohta

35. EC_{50} arvutamiseks on nõutav täielik kontsentratsiooni-vastuse kõver, kuid alati ei ole seda võimalik koostada või ei ole see praktiline uuritavast kontsentratsioonivahemikust tulenevate piirangute tõttu (nt tsütotoksilisus või probleemid lahustuvusega). EC_{50} ja maksimaalne induktsioonitase (mis vastab Hilli võrrandi suurimale väärtusele) on informatiivsed parameetrid, mida võimaluse korral tuleks dokumenteerida. EC_{50} ja maksimaalse induktsioonitaseme arvutamiseks tuleks kasutada asjakohast statistikatarkvara (nt Graphpad Prism). Kui Hilli logistiline võrrand on kontsentratsiooni-vastuse andmetele rakendatav, tuleks EC_{50} arvutada järgmise valemi alusel (7):

Y = alumine + (ülemine – alumine) / (1+10 exp ((log EC50 –X) × Hilli tõus)), kus:

X on logaritm kontsentratsioonist ning

Y on vastus, mis algab sigmoidse kõvera alumiselt platoolt ja liigub ülemise platooni. Alumiseks platooks on Hilli logistilises võrrandis võetud null.

36. Iga uuritava kemikaali kohta peavad olema esitatud järgmised andmed:

RPCmax, mis on uuritava kemikaali indutseeritud maksimaalne vastus, väljendatuna protsendina 1 nM E2 indutseeritud vastusest samal plaadil, samuti PC_{max} (RPCmax-ga seotud kontsentratsioon) ning

positiivsete kemikaalide korral indutseerivad kontsentratsioonid PC10 ja, kui see on asjakohane, siis PC50.

37. PC_x väärtuse saab arvutada, interpoleerides kahe punkti x- ja y-koordinaadi vahel, kusjuures üks neist punktidest on vahetult all- ja teine vahetult ülalpool PC_x väärtust. Vahetult all- ja ülalpool PC_x väärtust olevate andmepunktide koordinaatide (vastavalt (a,b) ja (c,d)) alusel saab järgmise valemi abil arvutada PC_x väärtuse:

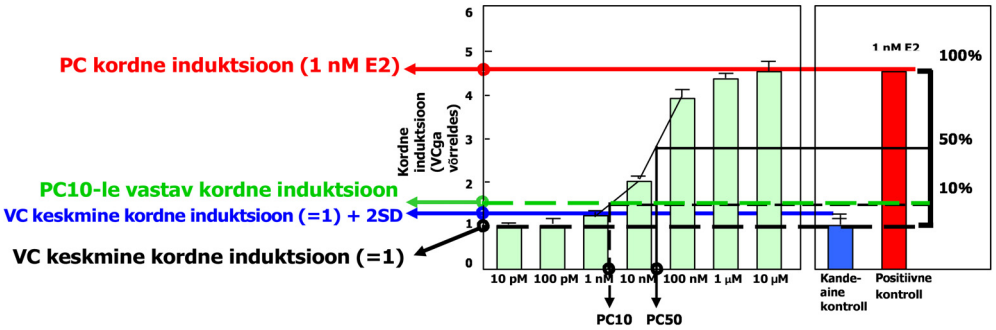
$\log[PC_x] = \log[c]+(x–d)/(d–b)$

▼M8

38. PC väärtusi kirjeldatakse allpool joonisel 1.

Joonis 1

Näide PC väärtuste arvutamisest. PC (1 nM E2) on lisatud igale analüüsitavale plaadile.



ERi antagonistikatse

39. ERi antagonistikatse korral tuleb positiivse kontrollaine (25 nM E2) suhtelise transkriptsiooni aktiivsuse (rikastatud kontrollproovi suhtes, 25 pM E2) leidmiseks analüüsida sama plaadi luminestsentssignaale, järgides järgmisi etappe (ka muud matemaatilised võtted on lubatud):

1. etapp. Arvutada kandeaine kontrollproovi keskväärtus.

2. etapp. Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine kontrollproovi keskväärtus iga süvendi puhul saadud väärtusest. 3. etapp. Arvutada normaliseeritud rikastatud kontrollproovi keskväärtus.

4. etapp. Jagada plaadi iga süvendi normaliseeritud väärtus normaliseeritud rikastatud kontrollproovi keskväärtusega (rikastatud kontrollproov = 100 %).

Viimane iga süvendi kohta saadu väärtus on kõnealuse süvendi suhteline transkriptsiooni aktiivsus rikastatud kontrollproovi vastusega võrreldes.

5. etapp. Arvutada iga töötluse kohta suhteliste transkriptsiooni aktiivsuste keskväärtus.

Kaalutlused IC_{30} ja IC_{50} induktsiooni kohta

40. Positiivsete kemikaalide korral tuleb esitada indutseerivad kontsentratsioonid IC_{30} ja, kui see on asjakohane, siis IC_{50}.

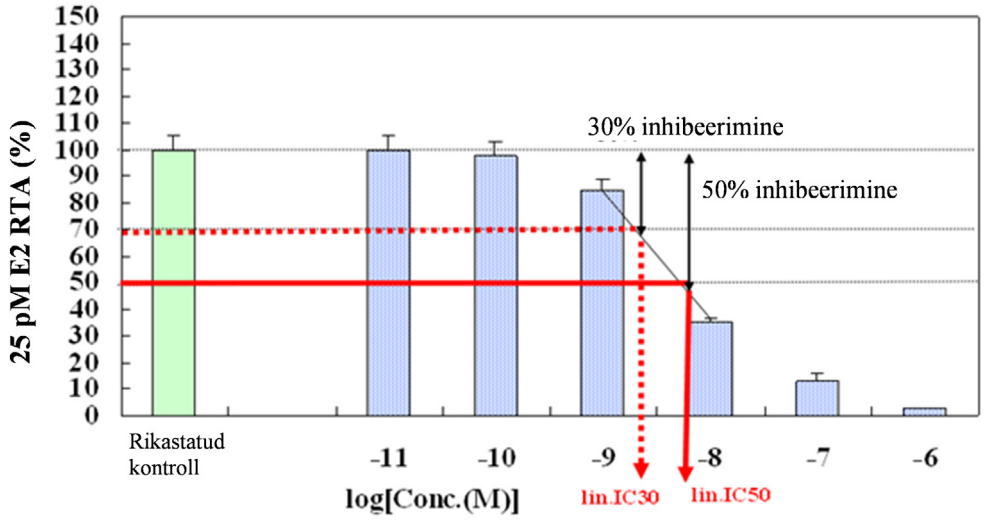
41. IC_x väärtuse saab arvutada, interpoleerides kahe punkti x- ja y-koordinaadi vahel, kusjuures üks neist punktidest on vahetult all- ja teine vahetult ülalpool IC_x väärtust. Vahetult all- ja ülalpool IC_x väärtust olevate andmepunktide koordinaatide (vastavalt (a,b) ja (c,d)) alusel saab järgmise valemi abil arvutada PC_x väärtuse:

$$\text{lin } IC_x = a–(b–(100–x))\ (a–c)\ /(b–d)$$

▼M8

Joonis 2

Näide IC väärtuste arvutamisest. Rikastatud kontrollproov (25 pM E2) on lisatud igale analüüsitavale plaadile



RTA: suhteline transkriptsiooni aktiivsus.

42. Tulemused peavad põhinema kahel (või kolmel) sõltumatul katsel. Kui kaks katset annavad võrreldavad ja seega korratavad tulemused, ei ole kolmandat katset vaja teha. Selleks, et olla vastuvõetavad, peavad tulemused:

— vastama nõuetekohasuse kriteeriumidele (vt nõuetekohasuse kriteeriumid punktides 14–20),

— olema korratavad.

Andmete tõlgendamise kriteeriumid

Tabel 7

Positiivseks ja negatiivseks klassifitseerimise otsuse kriteeriumid ERi agonistikatse korral

Positiivne	Kui leitud RPC_{max} on suurem kui 10 % positiivse kontrollprooviga vähemalt kahel katsel kahest või kolmest saadud vastusest või sellega võrdne.
Negatiivne	Kui leitud RPC_{max} ei ole vähemalt 10 % positiivse kontrollprooviga vähemalt kahel katsel kahest või kolmest saadud vastusest.

Tabel 8

Positiivseks ja negatiivseks klassifitseerimise otsuse kriteeriumid ERi antagonistikatse korral

Positiivne	Kui vähemalt kahel katsel kahest või kolmest on võimalik arvutada IC_{30}.
Negatiivne	Kui vähemalt kahel katsel kahest või kolmest ei ole võimalik IC_{30} arvutada.

▼**M8**

43. Andmete tõlgendamise kriteeriumid on esitatud tabelites 7 ja 8. Positiivset tulemust iseloomustatakse nii toime suurusjärgu kui ka kontsentratsiooniga, mille juures toime avaldub. Selleks võib tulemusi väljendada kontsentratsioonina, mille juures agonistikatses saadakse 50 % (PC_{50}) või 10 % (PC_{10}) positiivse kontrollproovi väärtustest ning antagonistikatses 50 % (IC_{50}) või 30 % (IC_{30}) rikastatud kontrollproovi väärtustest. Uuritav kemikaal määratakse siiski positiivseks, kui tema maksimaalne indutseeritud vastus (RPC_{max}) on suurem kui 10 % positiivse kontrollprooviga vähemalt kahel katsel kahest või kolmest saadud vastusest või sellega võrdne, ning uuritav kemikaal loetakse negatiivseks, kui RPC_{max} jääb vähemalt kahel katsel kahest või kolmest alla 10 % positiivse kontrollprooviga saadud vastusest.

44. ERi agonistikatse PC10, PC50 ja PCmax ning ERi antagonistikatse IC30 ja IC50 arvutused võib teha OECD avalikul veebisaidil ([1]) katsejuhendi juures leitava arvutustabeli abil.

45. On piisav, kui PC10 või PC50 ja IC30 või IC50 väärtused saadakse vähemalt kaks korda. Kuid kui sama kontsentratsioonivahemiku andmete baasjoon on varieeruv ning vastuvõetamatult suure variatsioonikordajaga (CV, %), võidakse andmed lugeda ebausaldusväärseks ning suure varieeruvuse põhjus tuleb kindlaks teha. PC_{10} arvutamiseks kasutatavate andmepunktide andmed, mida saadakse kolmest paralleelkatsest (st luminestsentsi intensiivsuse andmed), peavad olema variatsioonikordajaga alla 20 %.

46. Nõuetekohasuse kriteeriumide täitmine näitab, et katsesüsteem toimib korrektselt, kuid see ei taga täpsete andmete saamist mis tahes konkreetsel katsel. Esimese katse tulemuste kordamine on parim võimalus tagada täpsete andmete saamine.

47. Kui tegemist on ERi agonistikatsega, kus lisaks sõelumise ja prioriseerimise eesmärgile on nõutav täiendav teave, on positiivsete uuritavate kemikaalide puhul, eriti nende puhul, mille PC väärtus on 10–49 %, samuti kemikaalide puhul, mida kahtlustatakse olevat lutsiferaasi ülestimuleerijad, võimalik ERα antagonisti kasutades kinnitada, et tähendatud lutsiferaasi aktiivsus on üksnes ERα-spetsiifiline vastus (vt liide 2.1).

KATSEPROTOKOLL

48. Vt punkti 20 jaotises „ER TA katsemeetodi osad“.

KIRJANDUS

(1) OECD (2015), „Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity“, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 225), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(2) Escande, A. *et al.* (2006), „Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta“, *Biochem. Pharmacol.*, nr 71, lk 1 459–1 469.

(3) Kuiper, G. G., *et al.* (1998), „Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta“, *Endocrinol.,* nr 139, 4 252–4 263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen, M., *et al.* (1992), „Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction“, *FEMS Microbiol. Lett.*, nr 78(1), lk 89–94.

(5) Kobayashi, H., *et al.* (1995), „Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products“, *J. Vet. Med. Sci.*, nr 57(4), lk 769–71.

(6) Dussurget, O. ja Roulland-Dussoix, D. (1994), „Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera“, *Appl. Environ. Microbiol*., nr 60(3), lk 953–9.

(7) De Lean, A., Munson, P. J. ja Rodbard, D. (1978), „Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves“, *Am. J. Physiol*., nr 235, lk E97–E102.

▼**M8**

Liide 2.1

VALEPOSITIIVSED TULEMUSED: NENDE LUMINESTSENTSSIGNAALIDE HINDAMINE, MIDA RETSEPTORID EI VAHENDA

1. ERi agonistikatse valepositiivsed tulemused võivad olla põhjustatud lutsiferaasigeeni aktivatsioonist, mida ei vahenda ER, või geeniprodukti otsesest aktivatsioonist või sõltumatust fluorestsentsist. Selliseid mõjusid kajastab mittetäielik või ebahariliku kujuga annuse-vastuse kõver. Kui esineb selliste mõjude kahtlus, tuleks uurida ERi antagonisti (nt 4-hüdroksütamoksüfeen (OHT) mittetoksilises kontsentratsioonis) mõju vastusele. Puhas antagonist ICI 1827 80 ei pruugi selleks otstarbeks sobida, sest piisavas kontsentratsioonis võib ICI 1827 80 kandeaine kontrollprooviga saadud väärtust vähendada, mis omakorda mõjutab andmete analüüsi.

2. Selle lähenemisviisi nõuetekohasuse tagamiseks tuleb samal plaadil analüüsida järgmist:

   — tundmatu kemikaali agonistlik toime koos 10 μM OHTga ja ilma selleta;

   — kandeaine kontrollproov (kolm proovi);

   — OHT (kolm proovi);

   — 1 nM E2 (kolm proovi), agonisti positiivne kontrollproov;

   — 1 nM E2 + OHT (kolm proovi).

Andmete tõlgendamise kriteeriumid

Märkus: Kõigis süvendites olevaid proove tuleb töödelda samas kontsentratsioonis kandeainega.

— Kui ERi antagonistiga töötlemine ei mõjuta tundmatu kemikaali agonistlikku toimet, klassifitseeritakse tundmatu kemikaal negatiivseks.

— Kui tundmatu kemikaali agonistlik toime täielikult pärsitakse, rakendada otsustuskriteeriume.

— Kui madalaima kontsentratsiooni juures on agonistlik toime suurem kui PC_{10} saadud vastus või sellega võrdne, siis on tundmatu kemikaal inhibeeritud PC_{10} saadud vastusega võrdselt või rohkem. Arvutatakse ERiga töödeldud ja töötlemata süvendites saadud vastuste vahe, mida käsitletakse tõese vastusena ja kasutatakse asjakohaste parameetrite arvutamisel, mis võimaldavad teha otsuse klassifitseerimise kohta.

Andmete analüüs

Kontrollida toimivusnõudeid.

Kontrollida samades tingimustes töödeldud süvendites saadud tulemuste variatsioonikordajaid.

1. Arvutada kandeaine kontrollproovi keskväärtus.

2. Lahutada kandeaine kontrollproovi keskväärtus igas niisuguses süvendis saadud väärtusest, mida **ei ole** OHTga töödeldud.

3. Arvutada OHTga saadud tulemuste keskväärtus.

4. Lahutada kandeaine kontrollproovi keskväärtus igas OHTga töödeldud süvendis saadud väärtusest.

5. Arvutada positiivse kontrollproovi keskväärtus.

6. Arvutada kõigi teiste süvendite suhteline transkriptsiooni aktiivsus positiivse kontrollprooviga võrreldes.

▼**M8**

Liide 2.2

DEKSTRAANIGA KAETUD AKTIIVSÖEGA (DCC) TÖÖDELDUD SEERUMI VALMISTAMINE

1. Seerumi töötlemine dekstraaniga kaetud aktiivsöega (DCC) on levinud meetod rakkudes söötmesse lisatavast seerumist östrogeensete komponentide eemaldamiseks, et vältida vastuse nihet seoses seerumis sisalduvate jääköstrogeenidega. Seda metoodikat järgides saab töödelda 500 ml veiselooteseerumit (FBS).

Osad

2. Vaja läheb järgmisi materjale ja seadmeid.

   Materjalid

   Aktiivsüsi

   Dekstraan

   Magneesiumkloriidheksahüdraat, ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

   Sahharoos

   1 M HEPES-puhverlahus (pH 7,4)

   Filtrisüsteemist saadud ülipuhas vesi

   Seadmed

   Autoklaavitud klaasanum (suurus valitakse vajaduse järgi) Harilik laboritsentrifuug (mille temperatuuriks saab seada 4 °C)

Töö käik

3. Allpool kirjeldatud toimingud sobivad kasutamiseks 50 ml tsentrifuugianumatega.

   [1. päev] Valmistada dekstraankattega aktiivsöe suspensioon 1 l ülipuhta veega, mis sisaldab 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sahharoosi, 2,5 g aktiivsütt, 0,25 g dekstraani ja 5 mM HEPES-puhvrit, ning segada seda 4 °C juures üleöö.

   [2. päev] Jaotada suspensioon 50 ml tsentrifuugianumatesse ja tsentrifuugida kiirusel 10 000 p/min 4 °C juures 10 minutit. Eemaldada supernatant ja säilitada pool söesadet 4 °C juures 3. päeval kasutamiseks. Teine pool söest suspendeerida FBSis, mis on sadenemise vältimiseks aeglaselt sulatatud ning 30 minuti jooksul 56 °C juures inaktiveeritud, seejärel viia suspensioon autoklaavitud klaasnõusse, näiteks koonilisse kolbi. Segada suspensiooni aeglaselt 4 °C juures üleöö.

   [3. päev] Jaotada FBSis valmistatud suspensioon tsentrifuugianumatesse ja tsentrifuugida kiirusel 10 000 p/min 4 °C juures 10 minutit. Koguda FBS kokku ja viia uude söesademesse, mis valmistati 2. päeval. Suspendeerida söesade ja segada saadud suspensiooni aeglaselt autoklaavitud klaasnõus 4 °C juures üleöö.

   [4. päev] Jaotada suspensiooni tsentrifuugianumatesse ja tsentrifuugida kiirusel 10 000 p/min 4 °C juures 10 minutit, seejärel steriliseerida supernatant läbi 0,2 μm steriilse filtri filtrimise teel. Seda DCCga töödeldud FBSi tuleb säilitada -20 °C juures ja see tuleb ära kasutada ühe aasta jooksul.

▼**M8**

3. Liide

VM7LUC ÖSTROGEENIRETSEPTORITE TRANSAKTIVATSIOONI KATSEMEETOD, MILLEGA TEHAKSE KINDLAKS ÖSTROGEENIRETSEPTORI AGONISTID JA ANTAGONISTID

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

1. Selle katsemeetodiga kasutatakse rakuliini VM7Luc4E2 ([1]). Selle on valideerinud Ameerika Ühendriikide riikliku toksikoloogiaprogrammi alternatiivsete toksikoloogiameetodite ametitevaheline keskus (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) ja alternatiivmeetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (1). VM7Luc-rakuliinid ekspresseerivad valdavalt endogeenset ERα-d ja vähesel määral endogeenset ERβ-d (2, 3, 4).

2. See katsemeetod sobib paljude ainete uurimiseks eeldusel, et neid saab lahustada dimetüülsulfoksiidis (DMSO, CASi nr 67-68-5), need ei reageeri DMSOga ega rakkude söötmega ega ole uuritavate kontsentratsioonide juures tsütotoksilised. Kui DMSOd ei saa kasutada, võib kasutada muud kandeainet, näiteks etanooli või vett (vt punkt 12). VM7Luc ER TA (ant)agonistikatse tõendatud toimivus lubab oletada, et käesoleva katsemeetodiga saadud andmed võivad anda teavet ERi vahendatud toimemehhanismide kohta ning tuleks kaaluda nende kasutamist ainete prioriseerimiseks edasise uurimise eesmärgil.

3. See katsemeetod on välja töötatud spetsiaalselt hERα ja hERß vahendatud transaktivatsiooni tuvastamiseks, kasutades mõõdetava parameetrina kemoluminestsentsi. Kemoluminestsentsi kasutamine biokatsetes on laialt levinud, sest luminestsentsil on suur signaali-müra suhe. Jaanimardika lutsiferaasi aktiivsust võivad rakupõhistes katsetes segada ained, mis inhibeerivad lutsiferaasi ensüümi, põhjustades kas näilist inhibitsiooni või suurenenud luminestsentsi valgu stabiliseerimise tõttu. Peale selle on mõnede lutsiferaasipõhiste ERi reportergeeni uurivate katsemeetoditega üle 1 μM fütoöstrogeeni kontsentratsioonide juures teadaolevalt saadud luminestsentssignaali, mida ei vahenda retseptorid, vaid mida põhjustab lutsiferaasi reportergeeni üleaktiveerimine. Kuigi annuse-vastuse kõver näitab, et ERi süsteemi aktiveerumine toimub väiksematel kontsentratsioonidel, tuleb stabiilse transfektsiooniga ER TA katsesüsteemides hoolitalt uurida suurtel kontsentratsioonidel ilmnevat lutsiferaasi ekspressiooni, mida põhjustavad fütoöstrogeenid või samalaadsed ühendid, mis sarnaselt fütoöstrogeenile tekitavad lutsiferaasi reportergeeni üleaktivatsiooni.

4. Enne käesoleva katsemeetodi regulatiivsel eesmärgil kasutamist tuleks lugeda peatükke „Üldine sissejuhatus“ ja „ER TA katsemeetodi osad“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

([1]) Enne 2016. aasta juuni nimetati see rakuliin rakuliiniks BG1Luc. BG-1 rakke kirjeldasid algselt Geisinger jt (1998) (12) ning hiljem iseloomustasid neid Ameerika Ühendriikide riikliku keskkonnatervise instituudi (National Institute of Environmental Health Sciences – NIEHS) teadlased (13). Suhteliselt hiljuti avastati, et teadlaste kasutatavatel BG-11 rakkudel on olemas kaks varianti, BG-1 Fr ja BG-1 NIEHS. Nende kahe BG-1 rakuliini variandi põhjalik analüüs (sealhulgas DNA uuring), mille viis läbi Li koos kaastöötajatega (2014) (14), näitas, et BG-1 Fr oli unikaalne ja et BG-1 NIEHS, st katsemeetodi väljatöötamiseks kasutatud algne rakuliin, ei olnud BG-1 inimese munasarja kartsinoomi rakuliin, vaid hoopis inimese rinnavähi rakuliini MCF7 variant. Katsemeetodis kasutatud rakuliini, mida algselt nimetati BG1Luc4E2 (15), nimetatakse nüüd VM7Luc4E2 (V – variant; M7 – MCF7 rakud). Samuti nimetatakse katsemeetodit nüüd VM7Luc ER TA katsemeetodiks. Kuigi katsemeetodi aluseks oleva rakuliini päritolu on teine, ei mõjuta see avaldatud valideerimisuuringuid ega käesoleva katsemeetodi kasutamist östrogeense/antiöstrogeense toimega kemikaalide sõelumiseks.

▼M8

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

5. Katsemeetodit kasutatakse ERi ligandi sidumise kindlakstegemiseks, millele järgneb retseptori-ligandi kompleksi translokatsioon tuuma. Tuumas seondub retseptori-ligandi kompleks spetsiifilise DNA-vastuselemendiga ja transaktiveerib reportergeeni (*luc*), mille tulemusena tekib lutsiferaas ja valguse eraldumine, mida saab luminomeetriga kvantitatiivselt mõõta. Lutsiferaasi aktiivsust saab kiiresti ja odavalt hinnata paljude müügilolevate komplektidega. VM7Luc ER TA katsemeetodis kasutatakse *in vitro* ERi agonisti või antagonistina toimivate ainete kindlakstegemiseks inimese rinna adenokartsinoomi ER-tundlikku rakuliini VM7, millele on stabiilselt transfekteeritud jaanimardika *luc*-reporterkonstrukt, mida kontrollivad neli hiire piimanäärmekasvaja promootorist (MMTV) ülespoole jäävad östrogeeni vastuselementi. MMTV promootor annab ainult vähesel määral ristreaktsioone teiste steroidsete jamittesteroidsete hormoonidega (8). Andmete tõlgendamise kriteeriumeid on üksikasjalikult kirjeldatud punktis 41. Lühidalt öeldes tehakse positiivne vastus kindlaks kontsentratsiooni-vastuse kõvera abil, millel on vähemalt kolm punkti, mille veavahemikud (keskväärtus ± SD) ei kattu, samuti amplituudi muutusena (normeeritud suhtelisi valgusühikuid (RLU) vähemalt 20 % etalonainega (agonistikatse korral 17β-östradiool (E2, CASi nr 50-28-2)), antagonistikatse korral raloksüfeen HCl (Ral, CASi nr 84449-90-1) / E2 saadud maksimumväärtusest).

METOODIKA

Rakuliin

6. Katsemeetodiga tuleks kasutada stabiilse transfektsiooniga VM7Luc4E2 rakuliini. See rakuliin on praegu saadaval ainult tehnilise litsentsilepingu alusel California Ülikoolist asukohaga Davis, California, USA ([1]) ja ettevõttest Xenobiotic Detection Systems Inc., asukohaga Durham, North Carolina, USA ([2]).

Rakuliini stabiilsus

7. Rakuliini stabiilsuse ja terviklikkuse säilitamiseks tuleks rakke kasvatada külmutatud varudest kultiveerimissöötmes rohkem kui ühe passaaži võrra (vt punkt 9). Rakke ei tohiks kasvatada rohkem kui 30 passaaži. VM7Luc4E2 rakuliini puhul kestavad 30 passaaži kokku ligikaudu 3 kuud.

Rakkude kasvatamine ja plaadile kandmise tingimused

8. Järgida tuleb rakkude kasvatamise heas tavas (5, 6) esitatud eeskirju, et tagada kõigi materjalide ja meetodite kvaliteet ning säilitada mis tahes tehtava töö terviklikkus, nõuetekohasus ja korratavus.

9. VM7Luc4E2 rakke hoitakse RPMI 1 640 söötmes, millele on lisatud 0,9 % Pen-Strepi ja 8,0 % veiselooteseerumit (FBS), spetsiaalses koekultuuride inkubaatoris temperatuuril 37 ± 1°C ja 90 ± 5 % niiskuse juures keskkonnas, kus õhk sisaldab 5,0 ± 1 % CO_2.

10. Ligikaudu 80 % konfluentsuse saavutamisel külvatakse VM7Luc4E2 rakud ümber ja lastakse kohaneda östrogeenivaba keskkonnaga 48 tunni jooksul enne nende kandmist 96 süvendiga plaatidele, et neid uuritavate kemikaalidega töödelda ning analüüsida östrogeenist sõltuvat lutsiferaasi aktiivsuse

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-post: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc., 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-post: info@dioxins.com, telefon: 919-688-4804, faks: 919-688-4404

▼M8

induktsiooni. Östrogeenivaba sööde (EFM) sisaldab Dulbecco modifitseeritud fenoolpunasevaba Eagle'i minimaalsöödet (DMEM), millele on lisatud 4,5 % aktiivsöe/dekstraaniga töödeldud veiselooteseerumit, 1,9 % L-glutamiini ja 0,9 % Pen-Strepi. Ükski plasttarvik ei tohi ilmutada östrogeenset toimet (vt üksikasjalikku juhendit (7))

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

11. Katse nõuetekohaseks tunnistamise või tagasilükkamise aluseks on kõigi 96 süvendiga plaadil tehtud katsete puhul kasutatud etalonaine ja kontrollproovidega saadud tulemuste hinnang. Iga etalonainet uuritakse mitme eri kontsentratsiooni juures ning iga etalonaine ja kontrollaine kontsentratsiooniga tehakse mitu paralleelproovi. Tulemusi võrreldakse nende kvaliteedikontrolli proovide (QC) parameetritega, mis saadi agonistide ja antagonistide kohtaaja jooksul kogutud andmeid sisaldavatest andmebaasidest, mille iga labor on koostanud pädevuse tõendamise käigus. Kogutud andmetega andmebaase ajakohastatakse pidevalt etalonaine ja kontrollprooviga saadud väärtustega. Varustuse või laboritingimuste muutused võivad tingida vajaduse ajakohastatud andmebaasi loomiseks.

Agonistikatse

Vahemiku leidmise katse

- Induktsioon: induktsiooni mõõtmiseks plaadil jagatakse etalonaine E2 suurima kontsentratsiooni juures saadud suhteliste valgusühikute (RLU) keskväärtus DMSO kontrollprooviga saadud RLU keskväärtusega. Tavaliselt saavutatakse viiekordne induktsioon ning nõuetekohaseks tunnistamiseks peab induktsioon olema vähemalt neljakordne.

- DMSO kontrollprooviga saadud tulemused: lahusti kontrollprooviga saadud RLU väärtused ei tohi aja jooksul kogutud lahusti kontrollproovide tulemuste keskmisest RLU väärtusest erineda rohkem kui 2,5 standardhälbe võrra.

- Katse, mille puhul ei ole täidetud ükskõik kumb nõuetekohasuse kriteerium, tuleb tühistada ja uuesti läbi viia.

Tervikkatse

See hõlmab agonisti vahemiku leidmise katse nõuetekohasuse kriteeriume ning järgmist.

- Etalonainega saadud tulemused: etalonaine E2 kontsentratsiooni-vastuse kõver peab olema sigmoidne ning vähemalt kolm väärtust peavad paiknema kontsentratsiooni-vastuse kõvera lineaarvahemikus.

- Positiivse kontrolliga saadud tulemused: metoksükloori kontrollprooviga saadud RLU väärtused peavad olema suuremad kui DMSOga saadud keskväärtus pluss kolmekordne DMSO keskväärtuse standardhälve.

- Katse, mille puhul ei ole täidetud ükskõik milline nõuetekohasuse kriteerium, tuleb tühistada ja uuesti läbi viia.

Antagonistikatse

Vahemiku leidmise katse

- Vähenemine: vähenemise mõõtmiseks jagatakse etalonaine Ral/E2 suurima kontsentratsiooni juures saadud RLU keskväärtus DMSO kontrollprooviga saadud RLU keskväärtusega. Tavaliselt saavutatakse viiekordne vähenemine ning nõuetekohaseks tunnistamiseks peab vähenemine olema vähemalt kolmekordne.

- E2 kontrollproovidega saadud tulemused: E2 kontrollprooviga saadud RLU väärtused ei tohi aja jooksul kogutud E2 kontrollproovide tulemuste keskmisest RLU väärtusest erineda rohkem kui 2,5 standardhälbe võrra.

▼M8

- DMSO kontrollprooviga saadud tulemused: DMSO kontrollprooviga saadud RLU väärtused ei tohi aja jooksul kogutud lahusti kontrollproovide tulemuste keskmisest RLU väärtusest erineda rohkem kui 2,5 standardhälbe võrra.

- Katse, mille puhul ei ole täidetud ükskõik milline nõuetekohasuse kriteerium, tühistatakse ja tehakse uuesti.

Tervikkatse

See hõlmab antagonisti vahemiku leidmise katse nõuetekohasuse kriteeriume ning järgmist.

- Etalonainega saadud tulemused: etalonaine Ral/E2 kontsentratsiooni-vastuse kõver peab olema sigmoidne ning vähemalt kolm väärtust peavad paiknema kontsentratsiooni-vastuse kõvera lineaarvahemikus.

- Positiivse kontrolliga saadud tulemused: tamoksüfeeni/E2 kontrollprooviga saadud RLU väärtused peavad olema väiksemad kui E2 kontrollprooviga saadud keskväärtus miinus kolmekordne E2 kontrollproovi keskväärtuse standardhälve.

- Katse, mille puhul ei ole täidetud ükskõik milline nõuetekohasuse kriteerium, tühistatakse ja tehakse uuesti.

Etalonained, positiivsed ja lahusti kontrollproovid

Lahusti kontrollproov (agonisti- ja antagonistikatsed)

12. Uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatavat kandeainet tuleb katseliselt kontrollida kandeaine kontrollproovina. VM7Luc ER TA katsemeetodi valideerimisel kasutatud kandeaine oli 1 % (mahuprotsent) dimetüülsulfoksiid (DMSO, CASi nr 67-68-5) (vt punkt 24). Kui DMSO asemel kasutatakse muud kandeainet, tuleb katsed kõigi etalonainete, kontrollproovide ja uuritavate kemikaalidega vajaduse korral läbi viia samas kandeaines.

Etalonaine (agonisti vahemiku leidmine)

13. Etalonaine on E2 (CASi nr 50-28-2). Vahemiku leidmiskatseks tehakse etalonainest järjestikused lahjendused, nii et saadakse neljas kontsentratsioonis E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ ja $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), ning iga kontsentratsiooniga tehakse katse kahes süvendis.

Etalonaine (agonisti tervikkatse)

14. Tervikkatses koosnevad E2 proovid järjestikustest 1 : 2 lahjendustest, mille tulemusena saadakse 11 eri kontsentratsiooniga ($3{,}67 \times 10^{-10}$ kuni $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) E2 proovi, millest igaüht analüüsitakse paralleelselt kahes süvendis.

Etalonaine (antagonisti vahemiku leidmine)

15. Etalonaineks on Rali (CASi nr 84449-90-1) ja E2 (CASi nr 50-28-2) segu. Vahemiku leidmise katses valmistatakse Ral/E2 järjestikused lahjendused nii, et saadakse kolmes kontsentratsioonis Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$ ja $1{,}92 \times 10^{-10}$M), millest igaühele on lisatud muutmatus kontsentratsioonis ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2, analüüsitakse paralleelselt kahes süvendis.

Etalonaine (antagonisti tervikkatse)

16. Tervikkatses valmistatakse Ral/E2 järjestikused 1 : 2 lahjendused nii, et saadakse üheksas kontsentratsioonis Ral ($2{,}45\times 10^{-8}$ kuni $9{,}57 \times 10^{-11}$M), millest igaühele on lisatud muutmatus kontsentratsioonis ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) E2, analüüsitakse paralleelselt kahes süvendis.

Nõrgalt positiivne kontrollaine (agonist)

17. Nõrgalt positiivne kontrollaine on $9{,}06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-metoksükloor (metoksükloor; CASi nr 72-43-5) EFMis.

▼M8

Nõrgalt positiivne kontrollaine (antagonist)

18. Nõrgalt positiivne kontrollaine on 3,36 × 10^{-6} M tamoksüfeen (CASi nr 10540-29-1) EFMis, millele on lisatud 9,18 × 10^{-11} M E2.

E2 kontrollproov (ainult agonistikatse)

19. E2 kontrollproov koosneb 9,18 × 10^{-11} M E2-st EFMis ja seda kasutatakse negatiivse kontrollproovi baasjoone leidmiseks.

Kordne induktsioon (agonist)

20. Lutsiferaasi aktiivsuse indutseerimine etalonaine (E2) mõjul leitakse, jagades etalonaine E2 suurima kontsentratsiooniga saadud RLU keskväärtuse DMSO kontrollprooviga saadud RLU keskväärtusega ning tulemus peab olema rohkem kui neljakordne.

Kordne vähenemine (antagonist)

21. Etalonaine (Ral/E2) lutsiferaasi keskmine aktiivsus leitakse, jagades etalonaine Ral/E2 suurima kontsentratsiooniga saadud RLU keskväärtuse DMSO kontrollprooviga saadud RLU keskväärtusega ning tulemus peab olema rohkem kui kolmekordne.

Labori pädevuse tõendamine (vt käesoleva katsemeetodi jaotise „ER TA katsemeetodi osad“ punkti 14 ning tabeleid 3 ja 4).

Kandeaine

22. Uuritavad kemikaalid tuleb lahustada lahustis, milles nad lahustuvad ja mis on võimeline segunema rakkude söötmega. Sobivad kandeained on vesi, etanool (puhtusega 95–100 %) ja DMSO. Kui kasutatakse DMSOd, ei tohi selle kontsentratsioon ületada 1 mahuprotsenti. Mis tahes kandeaine korral tuleb tõendada, et maksimaalne kasutatav kogus ei ole tsütotoksiline ega sega analüüsimeetodi toimivust. Etalonaine ja kontrollained lahustatakse 100 % lahustis ning lahjendatakse seejärel EFMiga sobivate kontsentratsioonideni.

Uuritavate kemikaalide ettevalmistamine

23. Uuritavad kemikaalid lahustatakse 100 % DMSOs (või sobivas lahustis) ning lahjendatakse seejärel EFMiga sobivate kontsentratsioonideni. Enne lahustamist ja lahjendamist tuleb kõigil uuritavatel kemikaalidel lasta saavutada toatemperatuur. Uuritavate kemikaalide lahused tuleb iga katse jaoks värskelt valmistada. Lahustes ei tohi olla nähtavat sadet ega hägu. Etalonaine ja kontrollainetega võib valmistada suurema koguse põhilahust, kuid etalonaine, kontrollaine ja uuritavate kemikaalide lõplikud lahused tuleb valmistada värskelt enne igat katset ning kasutada 24 tunni jooksul valmistamisest alates.

Lahustuvus ja tsütotoksilisus: vahemiku leidmise kaalutlused

24. Vahemiku leidmise katse koosneb seitsme punkti leidmisest järjestikuste 1 : 10 lahjendustega, millest igaühest tehakse kaks paralleelproovi. Kõigepealt tehakse uuritavate kemikaalidega katseid kuni maksimaalse kontsentratsioonini 1 mg/ml (~1 mM) agonistikatse korral ja 20 μg/ml (~10 μM) antagonistikatse korral. Vahemiku leidmise katsete abil määratakse järgmised parameetrid:

— uuritava kemikaali algkontsentratsioon tervikkatses kasutamiseks;

— uuritava kemikaali lahjendused (1 : 2 või 1 : 5) tervikkatses kasutamiseks.

▼M8

25. Agonisti- ja antagonistikatse eeskirjad hõlmavad raku eluvõimelisuse / tsütotoksilisuse hindamist ning see kuulub ka vahemiku leidmise ja tervikkatse juurde. VM7Luc ER TA valideerimisel (1) rakkude eluvõimelisuse hindamiseks kasutatud tsütotoksilisuse määramise meetod oli skaleeritud kvalitatiivne visuaalne jälgimismeetod, kuid tsütotoksilisuse määramiseks võib kasutada ka kvantitatiivset meetodit (vt eeskirja (7)). Nende uuritava kemikaali kontsentratsioonidega saadud andmeid, mis põhjustavad eluvõimelisuse rohkem kui 20 % vähenemise, ei saa kasutada.

Kemikaaliga kokkupuude ja analüüsiplaadi jaotus

26. Rakud loendatakse ja külvatakse 96 süvendiga koekultuuriplaadile (2×10^5 rakku süvendi kohta), kus neid inkubeeritakse EFMis 24 tundi, et võimaldada rakkudel plaadile kinnituda. EFM eemaldatakse ning asendatakse EFMis lahustatud uuritavate ja võrdluskemikaalidega, plaati inkubeeritakse 19–24 tundi. Suure lenduvusega ainete korral on vaja erimeetmeid, sest kontrollproovid lähedal paiknevates süvendites võivad anda valepositiivseid tulemusi. Sellisel juhul on soovitatav kasutada kilekatteid, mis tõhusalt eraldavad üksikud süvendid katse läbiviimise ajaks.

Vahemiku leidmise katsed

27. Vahemiku leidmise katsetes kasutatakse kõiki 96 süvendiga plaadi süvendeid, et katsetada kuni kuut uuritavat kemikaali seitsmes järjestikuste 1 : 10 lahjendustega saadud kontsentratsioonis kahe paralleelproovina (vt jooniseid 1 ja 2).

— *Agonisti* vahemiku leidmise katses kasutatakse etalonainena E2 nelja kontsentratsiooni kahes paralleelproovis ning neli süvendit kulub DMSO kontrolli paralleelproovidele.

— *Antagonisti* vahemiku leidmise katses kasutatakse etalonainena Ral/E2, kus Ral on kolmes eri kontsentratsioonis, millele on lisatud $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2; seda lahust analüüsitakse kahes paralleelproovis ning nii E2 kontrollproovile kui ka DMSO-kontrollproovile kulub kolm paralleelsüvendit.

Joonis 1.

Agonisti vahemiku leidmise katse 96 süvendiga plaadi paigutus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Lühendid: E2-1 kuni E2-4 = etalonaine E2 kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC1-1 kuni TC1-7 = 1. uuritava kemikaali (TC1) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC2-1 kuni TC2-7 = 2. uuritava kemikaali (TC2) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC3-1 kuni TC3-7 = 3. uuritava kemikaali (TC3) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC4-1 kuni TC4-7 = 4. uuritava kemikaali (TC4) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC5-1 kuni TC5-7 = 5. uuritava kemikaali (TC5) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC6-1 kuni TC6-7 = 6. uuritava kemikaali (TC6) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); VC = kandeaine kontrollproov (DMSO [1 % (mahuprotsent) EFM]).

▼M8

Joonis 2.

Antagonisti vahemiku leidmise katse 96 süvendiga plaadi paigutus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Lühendid: E2 = E2 kontrollproov; Ral-1 kuni Ral-3 = etalonaine raloksüfeeni/E2 kontsentratsioonid (suuremasti väiksemani); TC1-1 kuni TC1-7 = 1. uuritava kemikaali (TC1) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC2-1 kuni TC2-7 = 2. uuritava kemikaali (TC2) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC3-1 kuni TC3-7 = 3. uuritava kemikaali (TC3) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC4-1 kuni TC4-7 = 4. uuritava kemikaali (TC4) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC5-1 kuni TC5-7 = 5. uuritava kemikaali (TC5) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC6-1 kuni TC6-7 = 6. uuritava kemikaali (TC6) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); VC = kandeaine kontrollproov (DMSO [1 % (mahuprotsent) EFM]).

Märkus: kõigi uuritavate kemikaalidega viiakse katse läbi $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 juuresolekul.

28. Igas süvendis on söötme soovitatav lõplik ruumala 200 µl. Kasutada ainult neid analüüsitavaid plaate, milles rakkude eluvõimelisus kõigis süvendites on vähemalt 80 %.

29. ***Agonisti*** tervikkatse jaoks lähtekontsentratsioonide määramist kirjeldatakse põhjalikult agonistikatse eeskirjas (7). Lühidalt, kasutatakse järgmisi kriteeriume.

— Kui uuritava kemikaali kontsentratsioonikõveral ei ole punkte, mis on suuremad kui DMSO kontrollprooviga saadud keskväärtus pluss kolmekordne standardhälve, viiakse tervikkatse läbi 11 järjestikuste 1 : 2 lahjendustega saadud kontsentratsioonis, alustades maksimaalsest lahustuvast kontsentratsioonist.

— Kui uuritava kemikaali kontsentratsioonikõveral on punkte, mis on suuremad kui DMSO kontrollprooviga saadud keskväärtus pluss kolmekordne standardhälve, peab 11 lahjenduse lähtekontsentratsioon tervikkatses olema 1 log suurem kui kontsentratsioon, millega vahemiku leidmise katses saadi suurim kohandatud RLU väärtus. 11 kontsentratsiooniga lahjendusskeem põhineb kas 1 : 2 või 1 : 5 lahjendustel vastavalt järgmistele kriteeriumidele:

11 kontsentratsiooniga järjestikusi 1 : 2 lahjendusi tuleks kasutada, kui vahemiku leidmise katses saadud kontsentratsiooni-vastuse kõveral põhjal kajastab saadav kontsentratsioonide vahemik kogu vastuste vahemikku. Muul juhul tuleks lahjendada vahekorras 1 : 5.

▼**M8**

— Kui uuritava kemikaali vahemiku leidmise katses saadud kontsentratsiooni-vastuse kõver on kahefaasiline, peab ka tervikkatse kajastama mõlemat faasi.

30. ***Antagonisti*** tervikkatse jaoks lähtekontsentratsioonide määramist kirjeldatakse põhjalikult antagonistikatse eeskirjas (7). Lühidalt, kasutatakse järgmisi kriteeriume.

— Kui uuritava kemikaali kontsentratsioonikõveral ei ole punkte, mis on väiksemad kui E2 kontrollprooviga saadud keskväärtus miinus kolmekordne standardhälve, viiakse tervikkatse läbi 11 järjestikuste 1 : 2 lahjendustega saadud kontsentratsioonis, alustades maksimaalsest lahustuvast kontsentratsioonist.

— Kui uuritava kemikaali kontsentratsioonikõveral on punkte, mis on väiksemad kui E2 kontrollprooviga saadud keskväärtus miinus kolmekordne standardhälve, peab 11 lahjenduse lähtekontsentratsioon tervikkatses olema üks järgmistest:

• kontsentratsioon, mis vahemiku leidmise katses annab vähima kohandatud RLU väärtuse;

• maksimaalne lahustuv kontsentratsioon (vt agonistikatse eeskiri (7), joonis 14-2);

• vähim tsütotoksiline kontsentratsioon (vt näiteks antagonistikatse eeskiri (7), joonis 14-3).

— 11 kontsentratsiooniga lahjendusskeem põhineb kas järjestikustel 1 : 2 või 1 : 5 lahjendustel vastavalt järgmistele kriteeriumidele:

11 kontsentratsiooniga järjestikusi 1 : 2 lahjendusi tuleks kasutada, kui vahemiku leidmise katses saadud kontsentratsiooni-vastuse kõveral põhjal kajastab saadav kontsentratsioonide vahemik kogu vastuste vahemikku. Muul juhul tuleks lahjendada vahekorras 1 : 5.

Tervikkatsed

31. Tervikkatse koosneb 11 kontsentratsiooniga järjestikustest lahjendustest (järjestikused lahjendused vahekorras kas 1 : 2 või 1 : 5 olenevalt tervikkatse kriteeriumide kohasest lähtekontsentratsioonist), kusjuures iga kontsentratsiooniga tehakse paralleelkatse 96 süvendiga plaadi kolmes süvendis (vt joonised 3 ja 4).

— *Agonisti* tervikkatses kasutatakse etalonainena E2 11 kontsentratsioonis kahes paralleelproovis. Igal plaadil tehakse neljas süvendis DMSO kontrollproovi paralleelkatsed ja veel neljas metoksükloori kontrollproovi ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M) paralleelkatsed.

— Antagonisti tervikkatses kasutatakse etalonainena Ral/E2 lahust Rali üheksas kontsentratsioonis, millele on lisatud muutumatult $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2, neljas süvendis on $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 paralleelkontrollproovid, neljas DMSO kontrollproovid ja neljas $3{,}36 \times 10^{-6}$M tamoksüfeeni paralleelproovid.

▼M8

Joonis 3.

Agonisti tervikkatse 96 süvendiga plaadi paigutus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Lühendid: TC1-1 kuni TC1-11 = 1. uuritava kemikaali kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC2-1 kuni TC2-11 = 2. uuritava kemikaali kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); E2-1 kuni E2-11 = etalonaine E2 kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); Meth = *p,p'*-metoksükloori nõrgalt positiivne kontrollproov; VC = DMSO (1 mahuprotsent) EFM kandeaine kontrollproov

Joonis 4.

Antagonisti tervikkatse 96 süvendiga plaadi paigutus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Lühendid: E2 = E2 kontrollproov; Ral-1 kuni Ral-9 = etalonaine raloksüfeeni/E2 kontsentratsioonid (suuremasti väiksemani); Tam = tamoksüfeeni/E2 nõrgalt positiivne kontrollproov; TC1-1 kuni TC1-11 = 1. uuritava kemikaali (TC1) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); TC2-1 kuni TC2-11 = 2. uuritava kemikaali (TC2) kontsentratsioonid (suuremast väiksemani); VC = kandeaine kontrollproov (DMSO [1 % (mahuprotsent) EFM]).

Märkus: nagu märgitud, sisaldavad kõik süvendid muutumatus kontsentratsioonis E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M).

32. Sõltumatuse tagamiseks tuleb sama kemikaaliga tervikkatseid korrata eri päevadel. Kokku tuleks teha vähemalt kaks tervikkatset. Kui katsete tulemused on vasturääkivad (nt üks positiivne, teine negatiivne) või kui üks katsetest ei ole nõuetekohane, tuleb täiendavalt teha kolmas katse.

Luminestsentsi mõõtmine

33. Luminestsentsi mõõdetakse lainepikkuste vahemikus 300 kuni 650 nm injektoriga luminomeetriga ning tarkvaraga, mis reguleerib süstitavat kogust ja mõõteintervalli (7). Igast süvendist emiteeritud valgust väljendatakse RLUdes süvendi kohta.

▼M8

ANDMEANALÜÜS

EC_{50}/IC_{50} määramine

34. EC_{50} väärtus (50 % uuritava kemikaali suurima toime avaldumise kontsentratsioonist (agonisti puhul)) ja IC_{50} väärtus (50 % uuritava kemikaali suurima inhibeeriva toime avaldumise kontsentratsioonist (antagonisti puhul)) määratakse kontsentratsiooni-vastuse andmete järgi. Ühe või mitme kontsentratsiooni juures positiivse uuritava kemikaali puhul arvutatakse uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis on 50 % suurima toime avaldumise kontsentratsioonist (IC_{50} või EC_{50}), Hilli funktsiooni analüüsi või asjakohase alternatiivi abil. Hilli funktsioon on nelja parameetriga matemaatiline logistiline mudel, mis esitab uuritava kemikaali kontsentratsiooni seose vastusega (tavaliselt sigmoidse kõvera järgi) allpool toodud võrrandi kohaselt,

$$Y = alumine + \frac{(ülemine - alumine)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hillitõus}$$

kus:

Y = vastus (st RLUd);

X = logaritm kontsentratsioonist;

alumine (platoo) = minimaalne vastus;

ülemine (platoo) = maksimaalne vastus;

lg EC_{50} (või lg IC_{50}) = logaritm X-ist, vastusest, mis jääb ülemise ja alumise platoo vahele;

Hilli tõus = kõvera tõus.

Mudeliga arvutatakse parim sobiv joon ülemise ja alumise platoo ning tõusu järgi ning parameetrite IC_{50} ja EC_{50}. EC_{50} ja IC_{50} väärtuste arvutamiseks tuleks kasutada asjakohast statistikatarkvara (nt Graphpad Prism®).

Võõrväärtuste määramine

35. Head statistilist hindamist võib hõlbustada Q-testi jms (vt eeskirjad agonisti ja antagonisti puhul (7)) kasutamine „kasutute“ süvendite leidmiseks, millega saadud tulemused tuleb andmete analüüsimisel kõrvale jätta.

36. E2 etalonaine paralleelproovide (kaks tk) korral loetakse paralleelproovi igasugune kohandatud RLU väärtus antud E2 kontsentratsiooni juures võõrväärtuseks, kui selle on rohkem kui 20 % suurem või väiksem kui aja jooksul kogutud andmete andmebaasis olev kohandatud RLU väärtus kõnealuse kontsentratsiooni jaoks.

Luminomeetriliste andmete kogumine ja kohandamine vahemiku leidmise katseks

37. Luminomeetrist saadud töötlemata andmed tuleb kanda katse jaoks välja töötatud arvutustabelisse. Tuleb kindlaks teha, kas on olemas võõrväärtusi, mis tuleks eemaldada. (Vt katse nõuetekohasuse kriteeriume nende parameetrite osas, mida analüüsides määratakse.) Teha tuleb järgmised arvutused.

Agonist

1. etapp Arvutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärtus.

2. etapp Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärtus iga süvendi puhul saadud väärtusest.

▼**M8**

3. etapp Arvutada etalonaine (E2) kordse induktsiooni keskväärtus.

4. etapp Arvutada uuritavate kemikaalide EC_{50} keskväärtused.

Antagonist

1. etapp Arvutada kandeaine DMSO kontrollproovi (VC) keskväärtus.

2. etapp Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärtus iga süvendi puhul saadud väärtusest.

3. etapp Arvutada etalonaine (Ral/E2) põhjustatud kordse vähenemise keskväärtus.

4. etapp Arvutada etalonaine E2 kontrollproovide keskväärtus.

5. etapp Arvutada uuritavate kemikaalide IC_{50} keskväärtused.

Luminomeetriliste andmete kogumine ja kohandamine tervikkatseks

38. Luminomeetrist saadud töötlemata andmed tuleb kanda katse jaoks välja töötatud arvutustabelisse. Tuleb kindlaks teha, kas on olemas võõrväärtusi, mis tuleks eemaldada. (Vt katse nõuetekohasuse kriteeriume nende parameetrite osas, mida analüüsides määratakse.) Tehakse järgmised arvutused.

Agonist

1. etapp Arvutada kandeaine DMSO kontrollproovi (VC) keskväärtus.

2. etapp Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärtus iga süvendi puhul saadud väärtusest.

3. etapp Arvutada etalonaine (E2) kordse induktsiooni keskväärtus.

4. etapp Arvutada E2 ja uuritavate kemikaalide EC_{50} keskväärtused.

5. etapp Arvutada metoksükloori kohandatud RLU keskväärtus.

Antagonist

1. etapp Arvutada kandeaine DMSO kontrollproovi (VC) keskväärtus.

2. etapp Andmete normaliseerimiseks lahutada kandeaine (DMSO) kontrollproovi (VC) keskväärtus iga süvendi puhul saadud väärtusest.

3. etapp Arvutada etalonaine (Ral/E2) põhjustatud kordse induktsiooni keskväärtus.

4. etapp Arvutada Ral/E2 ja uuritavate kemikaalide IC_{50} keskväärtused.

5. etapp Arvutada tamoksüfeeni kohandatud RLU keskväärtus.

6. etapp Arvutada etalonaine E2 kontrollproovide keskväärtus.

▼M8

Andmete tõlgendamise kriteeriumid

39. VM7Luc ER TA katsemeetod on kavandatud osana tõendite kaalukust arvestavast lähenemisviisist, et aidata aineid prioriseerida endokriinse häire põhjustamise *in vivo* uurimiseks. Üks kõnealuse prioriseerimise osadest on uuritava kemikaali klassifitseerimine kas positiivseks või negatiivseks ERi suhtes agonistliku või antagonistliku toime seisukohast. VM7Luc ER TA valideerimisuuringus kasutatud positiivseks ja negatiivseks klassifitseerimise otsustuskriteeriumid on esitatud tabelis 1.

Tabel 1.

Positiivseks ja negatiivseks klassifitseerimise otsustuskriteeriumid

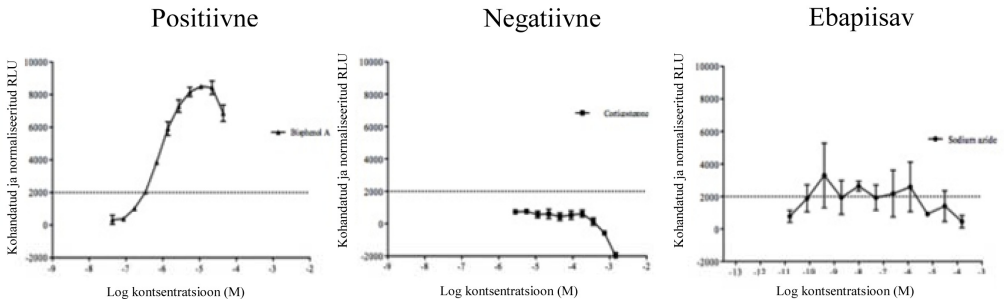
AGONISTLIK TOIME	
Positiivne	— Kõigil uuritavatel kemikaalidel, mis on ERi agonistliku toime järgi klassifitseeritud positiivseks, pean kontsentratsiooni-vastuse kõver sisaldama baasjoont, millele järgneb positiivne tõus, mis lõpeb platoo või tipuga. Mõnel juhul on võimalik kindlaks määrata üksnes kaks neist osadest (alumine platoo ja tõus või tõus ja ülemine platoo). — Positiivse tõusu joonel peab olema vähemalt kolm punkti, mille veavahemikud (keskväärtus ± SD) ei kattu. Alumist platood moodustavad punktid jäetakse välja, kuid kõvera lineaarvahemikku moodustavad punktid võivad sisaldada tipupunkti või platoo esimest punkti. — Positiivseks klassifitseerimiseks peab vastuse amplituud, st alumise ja ülemise platoo vaheline erinevus olema vähemalt 20 % etalonainega E2 saadud maksimaalsest väärtusest (st vähemalt 2000 RLUd, kui etalonaine (E2) vastuse maksimaalseks väärtuseks on seatud 10 000) RLUd). — Võimaluse korral arvutatakse iga positiivse uuritava kemikaali EC_{50} väärtus.
Negatiivne	Konkreetse kontsentratsiooni keskmine kohandatud RLU on väiksem või võrdne DMSO kontrollproovi RLU keskväärtusega, millele on liidetud DMSO kontrollproovi RLU väärtuse kolmekordne standardhälve.
Ebapiisav	Ebapiisavaks loetakse andmed, mida suurte kvalitatiivsete või kvantitatiivsete puuduste tõttu ei saa tõlgendada usaldusväärsetena toime olemasolu või selle puudumise kajastamisel, ning neid andmeid ei saa kasutada määramaks, kas uuritav kemikaal on positiivne või negatiivne. Kemikaalidega tuleks teha uued katsed.
ANTAGONISTLIK TOIME	
Positiivne	— Uuritava kemikaalide andmetest saab koostada kontsentratsiooni-vastuse kõvera, mis koosneb baasjoonest, millele järgneb negatiivne tõus. — Negatiivse tõusu joonel peab olema vähemalt kolm punkti, mille veavahemikud ei kattu. Baasjoont moodustavad punktid jäetakse välja, kuid kõvera lineaarvahemikku moodustavad punktid võivad sisaldada platoo esimest punkti. — Toime peaks olema vähemalt 20 % väiksem etalonainega Ral/E2 saadud maksimaalsest väärtusest (st 8 000 RLUd või vähem, kui etalonaine (Ral/E2) vastuse maksimaalseks väärtuseks on seatud 10 000 RLUd). — Uuritava kemikaali suurim mittetsütotoksiline kontsentratsioon peab olema 1×10^{-5} M või alla selle. — Võimaluse korral arvutatakse iga positiivse uuritava kemikaali IC_{50} väärtus.
Negatiivne	Kõik andmepunktid on suuremad kui EC_{80} väärtus (80 % E2-ga saadud vastusest või 8 000 RLUd) kontsentratsioonil alla $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Ebapiisav	Ebapiisavaks loetakse andmed, mida suurte kvalitatiivsete või kvantitatiivsete puuduste tõttu ei saa tõlgendada usaldusväärsetena toime olemasolu või selle puudumise kajastamisel, ning neid andmeid ei saa kasutada määramaks, kas uuritav kemikaal on positiivne või negatiivne. Kemikaaliga tuleks teha uued katsed.

▼**M8**

40. Positiivset tulemust iseloomustatakse nii toime suurusjärgu kui ka võimaluse korral kontsentratsiooniga, mille juures toime avaldub. Näited positiivsetest, negatiivsetest ja ebapiisavatest andmetest on esitatud joonistel 5 ja 6.

Joonis 5.

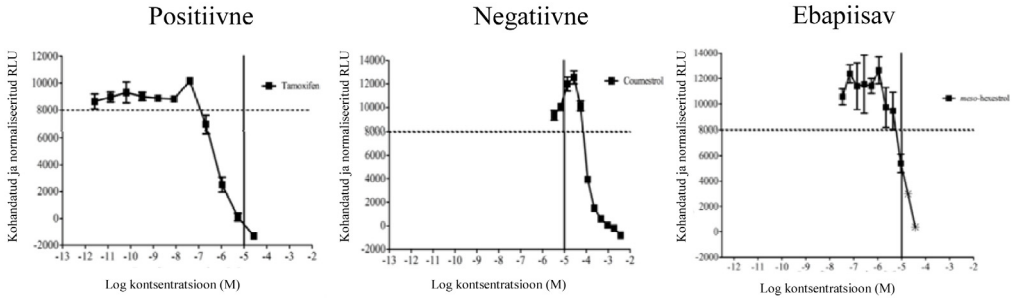
Näited agonisti kohta: positiivsed, negatiivsed ja ebapiisavad andmed



Punktiirjoon tähistab 20 % E2-ga saadud vastusest, 2000 kohandatud ja normaliseeritud RLUd.

Joonis 6.

Näited antagonisti kohta: positiivsed, negatiivsed ja ebapiisavad andmed



Punktiirjoon tähistab 80 % Ral/E2-ga saadud vastusest, 8 000 kohandatud ja normaliseeritud RLUd.

Pidevjoon tähistab kontsentratsiooni 1,00 × 10^{-5} M. Selleks, et vastus loetakse positiivseks, peab see kontsentratsioonidel alla 1,00 × 10^{-5}M jääma allapoole 8 000 RLU joont.

Meso-heksestrooli kõveral tärniga tähistatud kontsentratsioonidel juures on eluvõimelisus 2 või suurem.

Meso-heksestrooliga saadud katsetulemused loetakse ebapiisavateks andmetest, sest ainus vastus, mis jääb alla 8 000 RLU, ilmneb kontsentratsioonil 1,00 × 10^{-5} M.

41. EC_{50} ja IC_{50} saab arvutada nelja parameetriga Hilli funktsiooni abil (täpsem teave on agonistikatse ja antagonistikatse eeskirjades (7)). Nõuetekohasuse kriteeriumide täitmine näitab, et süsteem toimib korrektselt, kuid see ei taga täpsete andmete saamist mis tahes konkreetsel katsel. Esimese katse tulemuste kordamine on parim võimalus tagada täpsete andmete saamine (vt punkti 19 jaotises „ER TA katsemeetodi osad“).

▼**M8**

KATSEPROTOKOLL

42. Vt punkti 20 jaotises „ER TA katsemeetodi osad“.

KIRJANDUS

(1) ICCVAM (2011), „ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists“, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367-5373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5941.

(5) Balls, M. *et al.* (2006), „The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP)“, *ALTEX*, nr 23 (Lisa), lk 270–273.

(6) Coecke, S. *et al.* (2005), „Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice“, *Alternatives to Laboratory Animals*, nr 33, lk 261–287.

(7) ICCVAM (2011), „ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals“, NIH Publication nr 11–7850.

(8) Rogers, J.M., Denison, M.S. (2000), „Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals“ *, In Vitro Mol. Toxicol*., nr 13(1), lk 67–82.

(9) Escande, A. *et al.* (2006), „Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta“, *Biochem. Pharmacol.*, nr 71(10), lk 1459–69.

(10) Thorne, N., Inglese, J., Auld, D. S. (2010), „Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology“, *Chemistry and Biology* nr 17(6), lk 646–57.

(11) Kuiper, G. G. *et al.* (1998), „Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta“, *Endocrinology*, nr 139(10), lk 4252–63.

(12) Geisinger *et al.* (1989), „Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors“, *Cancer*, nr 63, lk 280–288.

(13) Baldwin *et al.* (1998), „BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*“, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, nr 34, lk 649–654.

(14) Li, Y. *et al.* (2014), „Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant“, *Mol. Endo.*, nr 28, lk 2072–2081.

(15) Rogers, J. M. ja Denison, M. S. (2000), „Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals“, *In Vitro & Molec. Toxicol.*, nr 13, lk 67–82.

▼**M8**

4. Liide

STABIILSE TRANSFEKTSIOONIGA INIMESE ÖSTROGEENI A-RETSEPTORI TRANSAKTIVATSIOONI (TA) KATSEMEETOD, MILLES UURITAKSE KEMIKAALIDE TOIMET ÖSTROGEENI AGONISTI VÕI ANTAGONISTINA, KASUTADES RAKULIINI ERA CALUX

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

1. ERα CALUX transaktivatsiooni katsemeetodis kasutatakse inimese rakuliini U2OS, et tuvastada toime östrogeeni agonistina või antagonistina, mida vahendab inimese östrogeeni α-retseptor (hERα). Stabiilse transfektsiooniga ERα CALUX biokatsemeetodi valideerimisuuring, mille tegi BioDetection Systems BV (Amsterdam, Madalmaad), tõendas katsemeetodi asjakohasust ja usaldusväärsust ettenähtud eesmärgil kasutades (1). Rakuliin ERα CALUX ekspresseerib ainult stabiilse transfektsiooniga inimese ERα-d (2) (3).

2. See katsemeetod on välja töötatud spetsiaalselt hERα-vahendatud transaktivatsiooni tuvastamiseks, kasutades mõõdetava parameetrina bioluminestsentsi. Bioluminestsentsi kasutamine on suure signaali-müra suhte tõttu biokatsetes üldlevinud (4).

3. Üle 1 μM fütoöstrogeeni kontsentratsioonid teadaolevalt üleaktiveerivad lutsiferaasi reportergeeni, mille tulemusena toimub luminestsents, mida ei vahenda retseptorid (5, 6, 7). Seetõttu tuleb stabiilse transfektsiooniga ERi transaktivatsiooni katsesüsteemides hoolikalt uurida fütoöstrogeenide või muude sarnaste ühendite suuri kontsentratsioone, mis võivad lutsiferaasi ekspressiooni üleaktiveerida (vt 2. liide).

4. Enne käesoleva katsemeetodi regulatiivsel eesmärgil kasutamist tuleks lugeda peatükke „Üldine sissejuhatus“ ja „ER TA katsemeetodi osad“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDIST SISSEJUHATUST)

5. Biokatsemeetodit kasutatakse ERi ligandi sidumise ja sellele järgneva retseptori-ligandi kompleksi tuuma suunatud translokatsiooni hindamiseks. Tuumas seondub retseptori-ligandi kompleks DNA spetsiifiliste vastuselementidega ja transaktiveerib jaanimardika lutsiferaasi reportergeeni, mille tulemusena suureneb ensüüm lutsiferaasi ekspressioon rakus. Pärast lutsiferaasi substraadi lutsiferiini lisamist muundatakse lutsiferiin bioluminestseeruvaks saaduseks. Eralduvat valgust on luminomeetri abil lihtne tuvastada ja kvantitatiivselt mõõta.

6. Katsesüsteemis kasutatakse stabiilse transfektsiooniga ERα CALUX rakke. ERα CALUX rakud on pärit inimese osteoblastilise osteosarkoomi rakuliinist U2OS. Inimese U2OS rakud transfekteeriti stabiilselt 3xHRE-TATA-Luci ja pSG5-neo-hERα-ga, kasutades kaltsiumfosfaadiga kaassadestamise meetodit. Rakuliin U2OS valiti välja kui parim östrogeenile (ja teistele steroidhormoonidele) reageeriv reporterrakuliin, mis põhineb tähelepanekul, et rakuliinil U2OS on retseptori endogeenne aktiivsus väike või puudub hoopis. Endogeensete retseptorite puudumist hinnati ainult lutsiferaasi reporterplasmiidide abil, mis ei ilmutanud retseptorligandide lisamisel mingit aktiivsust. Peale selle toetas nimetatud rakuliin tugevat hormoonvahendatud vastust, kui sellesse viidi ajutiselt sugulasretseptoreid (2, 3, 8).

7. Kemikaalide östrogeense või antiöstrogeense toime uurimine rakuliini ERα CALUX abil hõlmab eelnevat sõelkatset ja tervikkatseid. Eelneva sõelkatse käigus määratakse uuritavate kemikaalide lahustuvus, tsütotoksilisus ja

▼M8

täpsustatud, tervikkatses uuritavate kontsentratsioonide vahemik. Tervikkatsete käigus analüüsitakse uuritavaid kemikaale täpsustatud kontsentratsioonide vahemikus ERα CALUX biokatsemeetodi abil, millele järgneb uuritavate kemikaalide klassifitseerimine agonistideks ja antagonistideks.

8. Andmete tõlgendamise kriteeriumeid on üksikasjalikult kirjeldatud punktis 59. Lühidalt loetakse uuritav kemikaal antagonismi seisukohast positiivseks, kui vähemalt kaks uuritava kemikaali järjestikust kontsentratsiooni annavad vastuse, mis on suurem või võrdne 10 %ga etalonaine 17β-östradiooliga saadud maksimaalsest vastusest (PC_{10}). Uuritav kemikaal loetakse antagonismi seisukohast positiivseks, kui vähemalt kaks uuritava kemikaali järjestikust kontsentratsiooni annavad vastuse, mis on väiksem või võrdne 80 %ga etalonaine tamoksüfeeniga saadud maksimaalsest vastusest (PC_{80}).

METOODIKA

Rakuliinid

9. Katsemeetodiga tuleks kasutada stabiilse transfektsiooniga rakuliini U2OS ERα CALUX. Rakuliin on tehnilise litsentsilepingu alusel saadaval ettevõttest BioDetection Systems BV, asukohaga Amsterdam, Madalmaad.

10. Kasutada tuleks ainult mükoplasmavabu rakukultuure. Rakupartiidel peab olema sertifikaat, mis tõendab, et need ei ole mükoplasmaga saastunud, või tuleb enne kasutamist mükoplasma olemasolu katseliselt kontrollida. Mükoplasmainfektsiooni tuvastamiseks tuleks kasutada tundlikku RT-PCR-meetodit (polümeraasiahela reaktsioon reaalajas) (9).

Rakuliini stabiilsus

11. CALUX-rakkude stabiilsuse ja terviklikkuse säilitamiseks tuleb rakke hoida vedelas lämmastikus (–80 °C). Pärast rakkude sulatamist uue kultuuri külvamiseks tuleks rakke vähemalt kaks korda ümber külvata, enne kui neid kasutatakse kemikaalide agonistliku ja antagonistliku toime hindamiseks östrogeeni suhtes. Rakke ei tohiks ümber külvata rohkem kui 30 passaaži.

12. Selleks, et jälgida rakuliini stabiilsust ajas, tuleb kontrollida agonistliku ja antagonistliku toime katsesüsteemi reageerimisvõimet, hinnates etalonainega saadud parameetri EC_{50} või IC_{50} väärtusi. Peale selle tuleb kontrollida positiivse kontrollprooviga (PC) ja negatiivse kontrollprooviga (NC) saadud suhtelist induktsiooni. Tulemused peavad olema kooskõlas agonistliku toime (tabel 3C) või antagonistliku toime (tabel 4C) hindamiseks tehtava ERα CALUXi biokatse nõuetekohasuse kriteeriumidega. Etalonained ning positiivsed ja negatiivsed kontrollained on agonistliku ja antagonistliku toime hindamiseks esitatud vastavalt tabelites 1 ja 2.

Rakkude kasvatamine ja külvamistingimused

13. U2OS rakke kasvatatakse söötmes (sööde DMEM/F12 (1 : 1), mis sisaldab indikaatorina fenoolpunast ja millele on lisatud veiselooteseerumit (7,5 %), asendatavaid aminohappeid (1 %), 10 ühikut/ml penitsilliini, streptomütsiini ja selektiivainena genetitsiini (G-418)). Rakud pannakse CO_2-inkubaatorisse (5 % CO_2), kus temperatuur on 37 °C ja õhuniiskus 100 %. Kui rakud saavutavad 85–95 % konfluentsuse, külvatakse need ümber või valmistatakse ette külvamiseks 96 süvendiga mikrotiiterplaadile. Viimasel juhul suspendeeritakse rakud uuesti kontsentratsiooniga 1×10^5 rakku/ml katsesöötmes (DMEM/F12 (1 : 1), mis ei sisalda fenoolpunast ja millele on lisatud dekstraankattega aktiivsöega töödeldud veiselooteseerumit (5 mahuprotsenti), asendatavaid aminohappeid (1 mahuprotsent), 10 ühikut/ml penitsilliini ja streptomütsiini) ja külvatakse 96 süvendiga mikrotiiterplaadi süvenditesse (100 µl homogeniseeritud rakususpensiooni). Enne uuritava ainega töötlemist inkubeeritakse rakke 24 tundi CO_2-inkubaatoris (5 % CO_2, 37 °C, õhuniiskus 100 %) Plasttarvikud peavad olema östrogeenivabad.

▼M8

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

14. Uuritava(te) kemikaali(de) agonistlikku ja antagonistlikku toimet uuritakse katseseeriate abil. Katseseeria koosneb maksimaalselt kuuest mikrotiiterplaadist. Igas katseseerias on vähemalt üks täisseeria etalonaine lahjendustest, positiivne kontrollproov, negatiivne kontrollproov ja lahusti kontrollproovid. Joonistel 1 ja 2 on esitatud proovide paigutus plaadil agonisti ja antagonisti katseseeriate korral.

15. Iga etalonaine lahjendust, uuritavat kemikaali, lahusti kontrollproovi ning positiivset ja negatiivset kontrollproovi analüüsitakse kolme paralleelproovina. Kõik need kolm paralleelset analüüsi peavad vastama tabelis 3A ja 4A esitatud nõuetele.

16. Iga katseseeria esimesel plaadil mõõdetakse etalonaine (agonismi korral 17β-östradiool, antagonismi korral tamoksüfeen) täielikku lahjenduste seeriat. Selleks, et oleks võimalik võrrelda ülejäänud viie mikrotiiterplaadi analüüsi tulemusi etalonaine täieliku kontsentratsiooni-vastuse kõvera punkte sisaldava esimese mikrotiiterplaadi omadega, peavad kõik plaadid sisaldama kolme kontrollproovi: lahusti kontrollproov, uuritava etalonaine suurim kontsentratsioon ning etalonaine ligikaudne kontsentratsioon EC_{50} (agonismi korral) või IC_{50} (antagonismi korral). Esimese plaadi ja ülejäänud viie plaadi kontrollproovide keskmine suhtarv peab vastama tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral) esitatud nõuetele.

17. Iga katseseeria osaks oleva mikrotiiterplaadi kohta arvutatakse z-tegur (10). Z-teguri arvutamiseks kasutatakse etalonaine suurima ja vähima kontsentratsiooniga saadud vastuste abil. Mikrotiiterplaat loetakse nõuetekohaseks, kui see vastab tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral) esitatud nõuetele.

18. Etalonainega saadud annuse-vastuse kõver peab olema sigmoidne. Etalonaine lahjenduste seeriaga saadud vastustest tuletatud EC_{50} või IC_{50} peab vastama tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral) esitatud nõuetele.

19. Igas katseseerias peab olema positiivne ja negatiivne kontrollproov. Nii positiivse kui ka negatiivse kontrollproovi kohta arvutatud suhteline induktsioon peab vastama tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral) esitatud nõuetele.

20. Kõigi mõõtmiste käigus tuleb mõõta etalonaine suurima kontsentratsiooni induktsioonitegur, jagades selleks etalonaine 17β-östradiooli suurima kontsentratsiooniga saadud vastuse (suhtelistes valgusühikutes, RLU) keskmise väärtuse lahusti kontrollprooviga saadud vastuse (RLU) keskmise väärtusega. See induktsioonitegur peab vastama kordse induktsiooni miinimumnõuetele, mis on esitatud tabelis 3C (agonismi korral) või 4C (antagonismi korral).

21. Nõuetekohaseks loetakse ainult need mikrotiiterplaadid, mis vastavad kõigile eespool nimetatud kriteeriumidele; sel juhul võib neid kasutada uuritavate kemikaalide esile kutsutud vastuste hindamiseks.

22. Nõuetekohasuse kriteeriume kohaldatakse nii eelneva sõelkatse kui ka tervikkatsete suhtes.

▼M8

Tabel 1.

Etalonaine, positiivse kontrollaine (PC) ja negatiivse kontrollaine (NC) kontsentratsioonid agonistliku toime uurimiseks CALUXiga biokatsemeetodiga

	Aine	CASi nr	Uuritav vahemik (M)
Etalonaine	17β-östradiool	50-28-2	$1 \times 10^{-13} – 1 \times 10^{-10}$
Positiivne kontrollaine (PC)	17α-metüültestosteroon	58-18-4	3×10^{-6}
Negatiivne kontrollaine (NC)	Kortikosteroon	50-22-6	1×10^{-8}

Tabel 2.

Etalonaine, positiivse kontrollaine (PC) ja negatiivse kontrollaine (NC) kontsentratsioonid antagonistliku toime uurimiseks CALUX biokatsemeetodiga

	Aine	CASi nr	Uuritav vahemik (M)
Etalonaine	Tamoksüfeen	10540-29-1	$3 \times 10^{-9} – 1 \times 10^{-5}$
Positiivne kontrollaine (PC)	4-hüdroksütamoksüfeen	68047-06-3	1×10^{-9}
Negatiivne kontrollaine (NC)	Resveratrool	501-36-0	1×10^{-5}

Tabel 3.

Nõuetekohasuse kriteeriumid agonistliku toime uurimiseks ERα CALUX biokatsemeetodiga

A – üksikproove plaadil		**Kriteerium**
1	Kolmes süvendis paralleelproovide (negatiivne kontrollproov, positiivne kontrollproov, kõik uuritava kemikaali ja etalonaine lahjendused, välja arvatud C0) maksimaalne %SD	< 15 %
2	Kolmes süvendis paralleelproovide (etalonaine ja uuritava kemikaali lahusti kontrollproovid (C0, SC)) maksimaalne %SD	< 30 %
3	Maksimaalne LDH teke tsütotoksilisuse mõõduna.	< 120 %
B – ühe mikrotiiterplaadi ulatuses		
4	Etalonaine lahusti kontrollproovi (C0, plaat 1) ja uuritava kemikaali lahusti kontrollproovi (SC; plaadid 2–x) suhe	0,5 – 2,0
5	Plaadil 1 oleva etalonaine ligikaudse EC_{50} ja suurima kontsentratsiooni ning plaatidel 2–x olevate etalonaine ligikaudsete EC_{50} ja suurimate kontsentratsioonide (C4, C8) suhe	0,70 – 1,30
6	Iga plaadi z-tegur	> 0,6
C – ühe analüüsiseeria ulatuses (kõik ühe analüüsiseeria plaadid)		
7	Etalonaine sigmoidne kõver	Jah (17ß-östradiool)
8	Etalonaine 17ß-östradiooli EC_{50} vahemik	$4 \times 10^{-12} – 4 \times 10^{-11}$ M
9	17ß-östradiooli suurima kontsentratsiooni vähim kordne induktsioon võrrelduna etalonaine lahusti kontrollprooviga.	5
10	Positiivse kontrollproovi suhteline induktsioon (%)	> 30 %
11	Negatiivse kontrollproovi suhteline induktsioon (%)	< 10 %

▼M8

PC: positiivne kontrollproov; NC: negatiivne kontrollproov; SC: uuritava kemikaali lahusti kontrollproov; C0: etalonaine lahusti kontrollproov; SD: standardhälve; LDH: laktaadi dehüdrogenaas

Tabel 4.

Nõuetekohasuse kriteeriumid antagonistliku toime uurimiseks ERα CALUX biokatsemeetodiga

A – üksikproove plaadil		**Kriteerium**
1	Kolmes süvendis paralleelproovide (negatiivne kontrollproov, positiivne kontrollproov, kõik uuritava kemikaali ja etalonaine lahjendused, lahusti kontrollproov C0) maksimaalne %SD	< 15 %
2	Kolmes süvendis paralleelproovide (kandeaine kontrollproov (VC) ja etalonaine suurim kontsentratsioon (C8)) maksimaalne %SD	< 30 %
3	Maksimaalne LDH teke tsütotoksilisuse mõõduna.	< 120 %
B – ühe mikrotiiterplaadi ulatuses		
4	Etalonaine lahusti kontrollproovi (C0, plaat 1) ja uuritava kemikaali lahusti kontrollproovi (SC; plaadid 2–x) suhe	0,70 – 1,30
5	Plaadil 1 oleva etalonaine ligikaudse IC_{50} kontsentratsiooni ning plaatidel 2–x olevate etalonaine ligikaudsete IC_{50} kontsentratsioonide (C4) suhe	0,70 – 1,30
6	Plaadil 1 oleva etalonaine suurima kontsentratsiooni ning plaatidel 2–x olevate etalonaine suurimate kontsentratsioonide (C8) suhe	0,50 – 2,0
7	Iga plaadi z-tegur	> 0,6
C – ühe analüüsiseeria ulatuses (kõik ühe analüüsiseeria plaadid)		
8	Etalonaine sigmoidne kõver	Jah (tamoksüfeen)
9	Etalonaine (tamoksüfeen) IC_{50} vahemik	$1 \times 10^{-8} – 1 \times 10^{-7}$ M
10	Etalonaine lahusti kontrollproovi vähim kordne induktsioon võrrelduna tamoksüfeeni suurima kontsentratsiooniga.	2,5
11	Positiivse kontrollproovi suhteline induktsioon (%)	< 70 %
12	Negatiivse kontrollproovi suhteline induktsioon (%)	< 85 %

PC: positiivne kontrollproov; NC: negatiivne kontrollproov; VC: kandeaine kontrollproov (lahusti kontroll ilma agonisti etalonaine määratud kontsentratsioonita); SC: uuritava kemikaali lahusti kontrollproov; C0: etalonaine lahusti kontrollproov; SD: standardhälve; LDH: laktaadi dehüdrogenaas

Lahusti/kandeaine kontrollproov, etalonained, positiivsed kontrollproovid, negatiivsed kontrollproovid

23. Eelnevas sõelkatses ja tervikkatsetes kasutatakse sama lahusti/kandeaine kontrollproovi, samu etalonaineid, positiivseid ja negatiivsed kontrollproove. Lisaks peab etalonainete, positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide kontsentratsioon olema sama.

▼M8

Lahusti kontrollproov

24. Uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatavat lahustit tuleb katseliselt kontrollida lahusti kontrollproovina. ERα CALUX biokatsemeetodi valideerimisel kasutati kandeainena dimetüülsulfoksiidi (DMSO, 1 % (mahuprotsent), CASi nr 67-68-5). Kui DMSO asemel kasutatakse muud lahustit, tuleb katsed kõigi etalonainete, kontrollproovide ja uuritavate kemikaalidega läbi viia samas kandeaines. Antagonistlike omaduste uurimise korral sisaldab lahusti kontrollproov kindlas kontsentratsioonis agonistlikku etalonainet 17β-östradiooli (ligikaudne EC_{50} kontsentratsioon). Antagonistlike omaduste uurimisel kasutatava lahusti kontrollimiseks valmistatakse kandeaine kontrollproov ja analüüsitakse seda.

Kandeaine kontrollproov (antagonism)

25. Antagonistlike omaduste uurimiseks lisatakse katsesöötmesse kindlas kontsentratsioonis agonistlikku etalonainet 17β-östradiooli (ligikaudne EC_{50} kontsentratsioon). Antagonistlike omaduste suhtes uuritavate kemikaalide lahustamiseks kasutatava lahusti katseliseks kontrollimiseks valmistatakse katsesööde ilma kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistliku etalonaineta (17β-östradiool). Seda kontrollproovi nimetatakse kandeaine kontrollprooviks. ERα CALUX biokatsemeetodi valideerimisel kasutati kandeainena dimetüülsulfoksiidi (DMSO, 1 % (mahuprotsent), CASi nr 67-68-5). Kui DMSO asemel kasutatakse muud lahustit, tuleb katsed kõigi etalonainete, kontrollproovide ja uuritavate kemikaalidega läbi viia samas kandeaines.

Etalonained

26. Agonistlik etalonaine on 17β-östradiool (tabel 1). Etalonaineteks on 17β-östradiooli lahjenduste seeria, mis hõlmab kaheksat kontsentratsiooni (1×10^{-13}, 3×10^{-13}, 1×10^{-12}, 3×10^{-12}, 6×10^{-12}, 1×10^{-11}, 3×10^{-11}, 1×10^{-10} M).

27. Antagonistlik etalonaine on tamoksüfeen (tabel 2). Etalonaineteks on tamoksüfeeni lahjenduste seeria, mis hõlmab kaheksat kontsentratsiooni (3×10^{-9}, 1×10^{-8}, 3×10^{-8}, 1×10^{-7}, 3×10^{-7}, 1×10^{-6}, 3×10^{-6}, 1×10^{-5} M). Antagonistliku etalonaine kõigis kontsentratsioonides lahjendusi inkubeeritakse koos kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistliku etalonainega (17β-östradiool, 3×10^{-12} M)

Positiivne kontrollproov

28. Agonistlike omaduste uurimise korral on positiivseks kontrollaineks 17α-metüültestosteroon (tabel 1).

29. Antagonistlike omaduste uurimise korral on positiivseks kontrollaineks 4-hüdroksütamoksüfeen (tabel 2). Antagonistlikku positiivset kontrollproovi inkubeeritakse koos kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistliku etalonainega (17β-östradiool, 3×10^{-12} M)

Negatiivne kontrollproov

30. Agonistlike omaduste uurimise korral on negatiivseks kontrollaineks kortikosteroon (tabel 1).

31. Antagonistlike omaduste uurimise korral on negatiivseks kontrollaineks resveratrool (tabel 2). Antagonistlikku negatiivset kontrollproovi inkubeeritakse koos kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistliku etalonainega (17β-östradiool, 3×10^{-12} M)

▼M8

Labori pädevuse tõendamine (vt käesoleva katsemeetodi jaotise „ER TA katsemeetodi osad“ punkti 14 ning tabeleid 3 ja 4).

Kandeaine

32. Uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatav lahusti peab uuritava kemikaali täielikult lahustama ja segunema rakkude kasvusöötmega. Sobivad kandeained on DMSO, vesi ja etanool (puhtusega 95–100 %). Kui lahustina kasutatakse DMSOd, ei tohi DMSO maksimaalne kontsentratsioon inkubeerimise ajal ületada 1 mahuprotsenti. Enne kasutamist tuleb katseliselt kontrollides veenduda, et lahusti ei ole tsütotoksiline ega häiri katsemeetodi toimivust.

Etalonainete, positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide ning uuritavate kemikaalide ettevalmistamine

33. Etalonained, positiivsed ja negatiivsed kontrollained ning uuritavad kemikaalid lahustatakse 100 % DMSOs (või sobivas lahustis). Seejärel valmistatakse samas lahustis asjakohased lahjendused (seeriana). Enne lahustamist lastakse kõigil ainetele saavutada toatemperatuur. Etalonainete, positiivsete ja negatiivsete kontrollainete ning uuritava kemikaalide värskelt valmistatud põhilahustes ei tohi olla nähtavat sadet ega hägu. Etalonaine ja kontrollainetega võib valmistada suurema koguse põhilahust. Uuritavate kemikaalide põhilahused valmistatakse värskelt enne igat katset. Etalonainete, positiivsete ja negatiivsete kontrollainete ja uuritavate kemikaalide lõplikud lahjendused tuleb valmistada värskelt enne igat katset ning kasutada 24 tunni jooksul valmistamisest alates.

Lahustuvus, tsütotoksilisus ja vahemiku leidmine

34. Eelneva sõelkatsega määratakse uuritava kemikaali lahustuvus valitud lahustis. Valmistatakse põhilahus maksimaalse kontsentratsiooniga 0,1 M. Kui selle kontsentratsiooni juures tekib probleeme lahustuvusega, valmistatakse lahjemaid põhilahuseid, kuni uuritavad kemikaalid täielikult lahustuvad. Eelneva sõelkatse käigus analüüsitakse uuritava kemikaali lahjenduste seeriat, mis valmistatakse vahekorras 1 : 10. Maksimaalne analüüsitav kontsentratsioon agonistlike ja antagonistlike omaduste uurimisel on 1 mM. Pärast eelnevat sõelkatset tuletatakse täpsem sobivate kontsentratsioonide vahemik, mida tervikkatsete käigus analüüsida. Tervikkatsetes kasutatavad lahjendused peaksid olema 1-, 3-, 10-, 30-, 100-, 300-, 1000- ja 3000-kordsed.

35. Agonisti- ja antagonistikatse eeskirjad (11) hõlmavad tsütotoksilisuse uurimist. Tsütotoksilisuse katseline kontrollimine on ka eelneva sõelkatse ja tervikkatsete osa. ERα CALUXi biokatsemeetodi valideerimisel tsütotoksilisuse hindamiseks kasutatud meetod oli laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) eraldumise katse koos rakkude kvalitatiivse visuaalse kontrolliga (vt liide 4.1) pärast uuritava kemikaaliga töötlemist. Tsütotoksilisuse määramiseks võib kasutada ka muid kvantitatiivseid meetodeid (nt kolorimeetriline (MTT) meetod tetrasooliumiga, või CALUXi tsütotoksilisuse biokatse). Üldiselt loetakse tsütotoksiliseks uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus väheneb rohkem kui 20 % ning mida seetõttu ei saa andmete hindamisel kasutada. LDH eraldumise katse korral loetakse uuritava kemikaali kontsentratsioon tsütotoksiliseks, kui LDH eraldumine on üle 120 %.

▼M8

Uuritava kemikaaliga kokkupuude ja analüüsiplaadi jaotus

36. Pärast kolvitäie konfluentse rakukultuuri trüpsineerimist suspendeeritakse rakud uuesti kontsentratsiooniga 1×10^5 rakku/ml östrogeenivabas katsesöötmes. 100 µl uuesti suspendeeritud rakke külvatakse 96 süvendiga mikrotiiterplaadi seesmistesse süvenditesse. Välimised süvendid täidetakse 200 µl fosfaadiga puhverdatud füsioloogilise lahusega (PBS) (vt joonised 1 ja 2). Plaadile külvatud rakke inkubeeritakse 24 tundi CO_2-inkubaatoris (5 % CO_2, 37 °C, õhuniiskus 100 %).

37. Pärast inkubeerimist kontrollitakse plaate visuaalselt tsütotoksilisuse (vt liide 4.1), saastumise ja konfluentsuse suhtes. Katse läbiviimiseks kasutatakse ainult neid plaate, millel ei ole märke tsütotoksilisusest ega saastumisest ja mille konfluentsus on vähemalt 85 %. Seesmistest süvenditest eemaldatakse hoolikalt sööde ning asendatakse see 200 µl östrogeenivaba katsesöötmega, mis sisaldab asjakohases seeriana saadud lahjendusastmes etalonaineid, uuritavaid kemikaale, positiivseid ja negatiivseid kontrollaineid ning lahusti kontrollproovi (tabel 5: agonistlike omaduste uuring; tabel 6: antagonistlike omaduste uuring). Kõiki etalonaineid, uuritavaid kemikaale, positiivseid janegatiivseid kontrollproove ning lahusti kontrollproove analüüsitakse kolme paralleelproovina. Joonisel 1 on esitatud plaadi paigutus agonistikatse korral. Joonisel 2 on esitatud plaadi paigutus antagonistikatse korral. Eelneva sõelkatse ja tervikkatsete korral on plaadi paigutus samasugune. Antagonistikatse korral sisaldavad kõik seesmised süvendid peale kandeaine kontrollproovidega süvendite (VC) ka kindlas kontsentratsioonis agonistlikku etalonainet 17β-östradiooli (3×10^{-12} M). Etalonained C8 ja C4 tuleb lisada igale uuritava kemikaali proove sisaldavale plaadile.

38. Pärast rakkude töötlemist kõigi kemikaalidega inkubeeritakse 96 süvendiga mikrotiiterplaati veel 24 tundi CO_2-inkubaatoris (5 % CO_2, 37 °C, õhuniiskus 100 %).

Joonis 1.

Proovide paigutus 96 süvendiga mikrotiiterplaadil eelneva sõelkatse ja agonistliku toime hindamise korral.

Plaat 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Ülejäänud plaadid

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = etalonaine lahusti.

C(1–8) = etalonaine lahjenduste seeria (1–8, vähimast kontsentratsioonist suurimani).

▼M8

PC = positiivne kontrollproov.

NC = negatiivne kontrollproov.

TCx-(1–8) = uuritava kemikaali lahjendused (1–8, vähimast kontsentratsioonist suurimani) eelnevaks sõelkatseks ja uuritava kemikaali × agonistliku toime hindamiseks.

SC = uuritava kemikaali lahusti kontrollproov (optimaalne on sama lahusti, mis proovis C0, kuid see võib olla teisest põhilahusest).

Hallid väljad = välimised süvendid, mis täidetakse 200 µl PBSiga.

Joonis 2.

Proovide paigutus 96 süvendiga mikrotiiterplaadil antagonistliku toime uuringule eelneva sõelkatse ja antagonistliku toime hindamise korral.

Plaat 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Ülejäänud plaadid

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = etalonaine lahusti.

C(1–8) = etalonaine lahjenduste seeria (1–8, vähimast kontsentratsioonist suurimani).

NC = negatiivne kontrollproov.

PC = positiivne kontrollproov.

TCx-(1–8) = uuritava kemikaali lahjendused (1–8, vähimast kontsentratsioonist suurimani) eelnevaks sõelkatseks ja uuritava kemikaali × agonistliku toime hindamiseks.

SC = uuritava kemikaali lahusti kontrollproov (optimaalne on sama lahusti, mis proovis C0, kuid see võib olla teisest põhilahusest).

VC = kandeaine kontrollproov (lahusti kontroll ilma agonisti etalonaine 17β-östradiooli määratud kontsentratsioonita).

Hallid väljad = välimised süvendid, mis täidetakse 200 µl PBSiga.

Märkus: kõik seesmised süvendid peale kandeaine kontrollproovidega süvendite (VC) sisaldavad ka kindlas kontsentratsioonis agonistlikku etalonainet 17β-östradiooli (3,0 × 10^{-12} M).

Luminestsentsi mõõtmine

39. Luminestsentsi mõõtmist on üksikasjalikult kirjeldatud agonisti- ja antagonistikatse eeskirjades (10). Süvenditest eemaldatakse sööde ja rakud lüüsitakse, millele järgneb 24 tundi inkubeerimist, et rakumembraan avaneks ja lutsiferaasi aktiivsust oleks võimalik mõõta.

▼M8

40. Luminestsentsi mõõtmiseks on vaja kahe injektoriga luminomeetrit. Lutsiferaasi reaktsioon käivitatakse substraadi lutsiferiini süstimisega. Reaktsioon peatatakse 0,2 M NaOH lisamisega. Reaktsiooni peatatakse, et vältida luminestsentsi ülekandumist ühest süvendist teise.

41. Igast süvendist eraldunud valgus väljendatakse suhtelistes valgusühikutes (RLU) süvendi kohta.

Eelnev sõelkatse

42. Eelnevas sõelkatses saadud analüüsitulemusi kasutatakse uuritavate kemikaalide täpsema kontsentratsioonivahemiku määramiseks tervikkatsete jaoks. Eelnevas sõelkatses saadud analüüsitulemuste hindamist ja uuritavate kemikaalide täpsema kontsentratsioonivahemiku määramist tervikkatsete jaoks on süvitsi kirjeldatud agonisti- ja antagonistikatse eeskirjades (10). Siin on esitatud lühikokkuvõte eeskirjadest, mida järgides määratakse uuritavate kemikaalide kontsentratsioonivahemik agonisti- ja antagonistikatse jaoks. Lahjendusteseeria ülesehituse juhised on esitatud tabelites 5 ja 6.

Kontsentratsioonide valimine agonistliku toime hindamiseks

43. Eelnevas sõelkatses analüüsitakse uuritavaid kemikaale, kasutades tabelites 5 (agonism) ja 6 (antagonism) esitatud lahjendusteseeriaid. Kõiki kontsentratsioone analüüsitakse paralleelproovidena kolmes süvendis vastavalt joonisel 1 (agonism) või 2 (antagonism) esitatud proovide paigutusele plaadil.

44. Nõuetekohaseks loetakse ainult need analüüsitulemused, mis vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele (tabel 3); sel juhul võib neid kasutada uuritavate kemikaalide esile kutsutud vastuste hindamiseks. Kui üks või mitu mikrotiiterplaati analüüsiseerias ei vasta nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleb vastavaid mikrotiiterplaate uuesti analüüsida. Kui nõuetekohasuse kriteeriumidele ei vasta esimene plaat, mis sisaldab etalonaine lahjenduste täielikku seeriat, tuleb uuesti analüüsida kogu katseseeria (6 plaati).

45. Uuritavate kemikaalide kontsentratsioonide vahemikku tuleb kohandada ja eelnevat sõelkatset korrata, kui:

— ilmneb tsütotoksilisus. Eelnevalt sõelkatset tuleb korrata uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooniga, mis ei ole tsütotoksiline;

— uuritava kemikaali eelnevas sõelkatses ei saa täielikku doosi-vastuse kõverat, sest uuritavad kontsentratsioonid annavad maksimaalse induktsiooni. Eelnevalt sõelkatset tuleb korrata uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooniga.

46. Kui leitakse nõuetekohane doosi-vastuse seos, tuleb valida (vähim) kontsentratsioon, mille juures saadakse maksimaalne induktsioon ega esine tsütotoksilisust. Tervikkatsetes analüüsitav uuritava kemikaali suurim kontsentratsioon peaks olema kõnealusest valitud kontsentratsioonist 3 korda suurem.

47. Uuritava kemikaali täielik täpsem lahjenduste seeria valmistatakse tabelis 5 esitatud lahjendusetappide kohaselt, alustatud eespool määratud suurimast kontsentratsioonist.

▼**M8**

48. Uuritavat kemikaali, mille puhul ei ilmne mingit agonistlikku toimet, tuleks tervikkatsetes analüüsida, alustades eelnevas sõelkatses määratud suurima kontsentratsiooniga, mis ei ole tsütotoksiline.

Kontsentratsioonide valimine antagonistliku toime hindamiseks

49. Nõuetekohaseks loetakse ainult need analüüsitulemused, mis vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele (tabel 4); sel juhul võib neid kasutada uuritavate kemikaalide esile kutsutud vastuste hindamiseks. Kui üks või mitu mikrotiiterplaati analüüsiseerias ei vasta nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleb vastavaid mikrotiiterplaate uuesti analüüsida. Kui nõuetekohasuse kriteeriumidele ei vasta esimene plaat, mis sisaldab etalonaine lahjenduste täielikku seeriat, tuleb uuesti analüüsida kogu katseseeria (6 plaati).

50. Uuritavate kemikaalide kontsentratsioonide vahemikku tuleb kohandada ja eelnevat sõelkatset korrata, kui:

— ilmneb tsütotoksilisus. Eelnevalt sõelkatset tuleb korrata uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooniga, mis ei ole tsütotoksiline;

— uuritava kemikaali eelnevas sõelkatses ei saa täielikku doosi-vastuse kõverat, sest uuritavad kontsentratsioonid annavad maksimaalse inhibitsiooni. Eelnevalt sõelkatset tuleb korrata uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooniga.

51. Kui leitakse nõuetekohane doosi-vastuse seos, tuleb valida (vähim) kontsentratsioon, mille juures saadakse maksimaalne inhibitsioon ega esine tsütotoksilisust. Tervikkatsetes analüüsitav uuritava kemikaali suurim kontsentratsioon peaks olema kõnealusest valitud kontsentratsioonist 3 korda suurem.

52. Uuritava kemikaali täielik täpsem lahjenduste seeria valmistatakse tabelis 6 esitatud lahjendusetappide kohaselt, alustatud eespool määratud suurimast kontsentratsioonist.

53. Uuritavat kemikaali, mille puhul ei ilmne mingit antagonistlikku toimet, tuleks tervikkatsetes analüüsida, alustades eelnevas sõelkatses uuritud suurima kontsentratsiooniga, mis ei ole tsütotoksiline.

Tervikkatsed

54. Pärast täpsema kontsentratsioonivahemiku valimist analüüsitakse uuritavaid kemikaale tervikkatsetes, kasutades tabelites 5 (agonism) ja 6 (antagonism) esitatud lahjendusteseeriaid. Kõiki kontsentratsioone analüüsitakse paralleelproovidena kolmes süvendis vastavalt joonisel 1 (agonism) või 2 (antagonism) esitatud proovide paigutusele plaadil.

55. Nõuetekohaseks loetakse ainult need analüüsitulemused, mis vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele (tabelid 3 ja 4); sel juhul võib neid kasutada uuritavate kemikaalide esile kutsutud vastuste hindamiseks. Kui üks või mitu mikrotiiterplaati analüüsiseerias ei vasta nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleb vastavaid mikrotiiterplaate uuesti analüüsida. Kui nõuetekohasuse kriteeriumidele ei vasta esimene plaat, mis sisaldab etalonaine lahjenduste täielikku seeriat, tuleb uuesti analüüsida kogu katseseeria (6 plaati).

▼**M8**

Tabel 5.

Etalonainete, kontrollainete ja uuritavate kemikaalide kontsentratsioonid ja lahjendused agonistikatse jaoks

Etalonaine 17β-östradiool		TCx – eelkatse		TCx – tervikkatse		Kontrollproovide	
konts. (M)		lahjendus		Lahjendus		konts. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 ×	TCx-1	3 000 ×	PC	3×10^{06}
C1	1×10^{-13}	TCx-2	1 000 000 ×	TCx-2	1 000 ×	NC	1×10^{-8}
C2	3×10^{-13}	TCx-3	100 000 ×	TCx-3	300 ×	C0	0
C3	1×10^{-12}	TCx-4	10 000 ×	TCx-4	100 ×	SC	0
C4	3×10^{-12}	TCx-5	1 000 ×	TCx-5	30 ×		
C5	6×10^{-12}	TCx-6	100 ×	TCx-6	10 ×		
C6	1×10^{-11}	TCx-7	10 ×	TCx-7	3 ×		
C7	3×10^{-11}	TCx-8	1 ×	TCx-8	1 ×		
C8	1×10^{-10}						

TCx – uuritav kemikaal x
PC – positiivne kontrollproov (17α-metüültestosteroon)
NC – negatiivne kontrollproov (kortikosteroon)
C0 – etalonaine lahusti kontrollproov
SC – uuritava kemikaali lahusti kontrollproov

▼**M8**

Tabel 6.

Etalonainete, kontrollainete ja uuritavate kemikaalide kontsentratsioonid ja lahjendused antagonistikatse jaoks

Etalonaine tamoksüfeen		TCx – eelkatse		TCx – tervikkatse		Kontrollproovide	
konts. (M)		lahjendus		lahjendus		konts. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 ×	TCx-1	3 000 ×	PC	1×10^{-9}
C1	3×10^{-09}	TCx-2	1 000 000 ×	TCx-2	1 000 ×	NC	1×10^{-5}
C2	1×10^{-08}	TCx-3	100 000 ×	TCx-3	300 ×	C0	0
C3	3×10^{-08}	TCx-4	10 000 ×	TCx-4	100 ×	SC	0
C4	1×10^{-07}	TCx-5	1 000 ×	TCx-5	30 ×		
C5	3×10^{-07}	TCx-6	100 ×	TCx-6	10 ×	**Lisatud agonisti**	
C6	1×10^{-06}	TCx-7	10 ×	TCx-7	3 ×	**konts. (M)**	
C7	3×10^{-06}	TCx-8	1 ×	TCx-8	1 ×	17β-östradiool	3×10^{-12}
C8	1×10^{-05}						

TCx – uuritav kemikaal x

PC – positiivne kontrollproov (4-hüdroksütamoksüfeen)

NC – negatiivne kontrollproov (resveratrool)

C0 – etalonaine lahusti kontrollproov

SC – uuritava kemikaali lahusti kontrollproovVC – kandeaine kontrollproov (ei sisalda kindlas kontsentratsioonis lisatud agonistlikku etalonainet (17β-östradiool, $3{,}0 \times 10^{-12}$ M)

▼M8

Andmete kogumine ja analüüs

56. Pärast eelnevat sõelkatset ja tervikkatseid määratakse agonistikatse korral uuritava kemikaali EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} ning maksimaalset induktsiooni esile kutsuv kontsentratsioon (TCx_{max}). Antagonistikatse korral arvutatakse IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} ja minimaalset induktsiooni esile kutsuv kontsentratsioon (TCx_{min}). Joonistel 3 (agonism) ja 4 (antagonism) on need parameetrid graafiliselt esitatud. Nõutavad parameetrid arvutatakse iga uuritava kemikaali suhtelise induktsiooni (võrreldes etalonaine maksimaalse induktsiooniga (= 100 %)) järgi. Andmete hindamiseks kasutatakse mittelineaarset regressiooni (muutuv tõus, 4 parameetrit) vastavalt järgmisele võrrandile:

$$Y = alumine + \frac{(\text{ülemine} - \text{alumine})}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hilli\ tõus)})}$$

kus:

X = doosi või kontsentratsiooni logaritm

Y = vastus (suhteline induktsioon (%))

Ülemine (platoo) = maksimaalne induktsioon (%)

Alumine (platoo) = minimaalne induktsioon (%)

$LogEC_{50}$ = logaritm kontsentratsioonist, mille juures täheldati 50 % maksimaalsest vastusest

HillSlope = Hilli tõus (Hilli koefitsient)

57. Luminomeetrist saadud töötlemata andmed tuleb kanda eelneva sõelkatse ja tervikkatsete jaoks välja töötatud arvutustabelisse. Töötlemata andmed peavad vastama nõuetekohasuse kriteeriumidele, mis on esitatud tabelites 3A ja 3B (antagonism) või 4A ja 4B (antagonism). Kui töötlemata andmed vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele, määratakse nõutavad parameetrid järgmisi arvutusetappi järgides.

Agonism

— Lahutada etalonaine lahusti kontrollproovi keskmine RLU väärtus etalonainete töötlemata analüüsitulemusest.

— Lahutada uuritava kemikaali lahusti kontrollproovi keskmine RLU väärtus uuritava kemikaali proovide töötlemata analüüsitulemusest.

— Arvutada etalonaine iga kontsentratsiooni jaoks suhteline induktsioon. Võtta 100 % induktsiooniks etalonaine suurima kontsentratsiooniga saadud induktsioon.

— Arvutada uuritava kemikaali iga kontsentratsiooniga seotud suhteline induktsioon võrreldes etalonaine suurima kontsentratsiooniga saadud induktsiooniga (100 %).

— Hinnata analüüsitulemust mittelineaarse regressiooni (muutuv tõus, 4 parameetrit) alusel.

▼**M8**

— Leida etalonaine EC_{50} ja EC_{10}.

— Leida uuritavate kemikaalide EC_{50} ja EC_{10}.

— Leida uuritava kemikaali maksimaalne suhteline induktsioon (TC_{max}).

— Leida uuritavate kemikaalide PC_{10} ja PC_{50}.

Uuritavate kemikaalide puhul ei ole näiteks tsütotoksilisuse või lahustuvusprobleemide tõttu võimalik alati täielikku doosi-vastuse kõverat leida. Sel juhul ei saa EC_{50}, EC_{10} ja PC_{50} leida. Siis saab leida üksnes PC_{10} ja TC_{max}.

Antagonism

— Lahutada etalonaine suurima kontsentratsiooniga saadud keskmine RLU väärtus etalonainete töötlemata analüüsitulemusest.

— Lahutada etalonaine suurima kontsentratsiooniga saadud keskmine RLU väärtus uuritavate kemikaalide töötlemata analüüsitulemusest.

— Arvutada etalonaine iga kontsentratsiooni jaoks suhteline induktsioon. Võtta 100 % induktsiooniks etalonaine vähima kontsentratsiooniga saadud induktsioon.

— Arvutada uuritava kemikaali iga kontsentratsiooniga seotud suhteline induktsioon võrreldes etalonaine vähima kontsentratsiooniga saadud induktsiooniga (100 %).

— Hinnata analüüsitulemust mittelineaarse regressiooni (varieeruv tõus, 4 parameetrit) alusel.

— Leida etalonaine IC_{50} ja IC_{20}.

— Leida uuritavate kemikaalide IC_{50} ja IC_{20}.

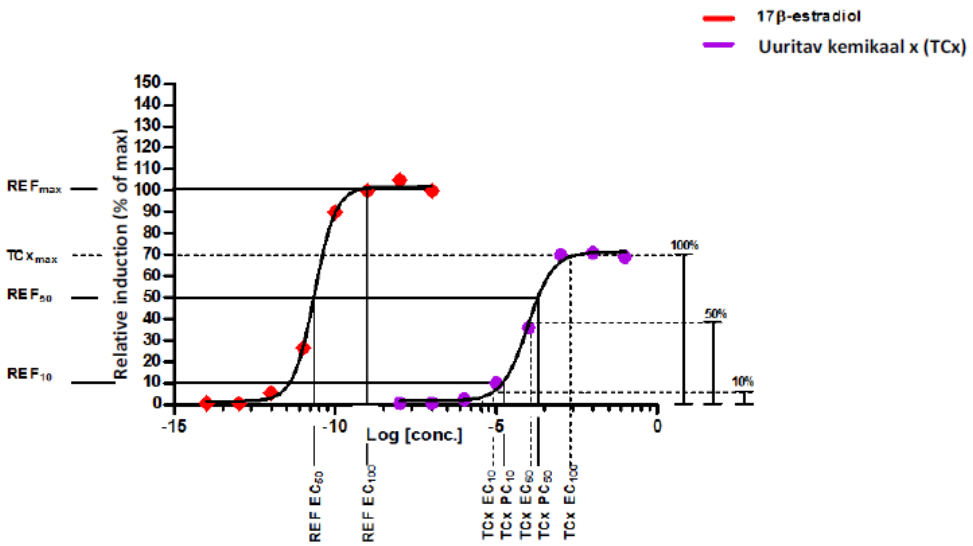
— Leida uuritava kemikaali minimaalne suhteline induktsioon (TC_{min}).

— Leida uuritavate kemikaalide PC_{80} ja PC_{50}.

▼M8

Joonis 3.

Agonistikatsega leitud parameetrite ülevaade



EC_{10} = aine kontsentratsioon, mille juures täheldati 10 % selle maksimaalsest vastusest.

EC_{50} = aine kontsentratsioon, mille juures täheldati 50 % selle maksimaalsest vastusest.

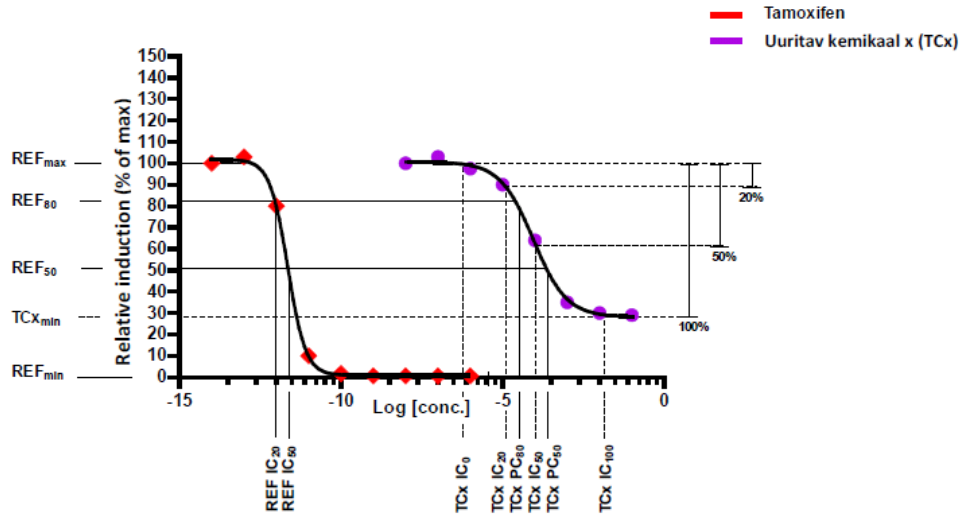
PC_{10} = uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures vastus on võrdne etalonaine EC_{10} väärtusega.

PC_{50} = uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures vastus on võrdne etalonaine EC_{50} väärtusega.

TCx_{max} = uuritava kemikaali maksimaalne suhteline induktsioon.

Joonis 4.

Antagonistikatsega leitud parameetrite ülevaade



IC_{20} = aine kontsentratsioon, mille juures täheldati 80 % selle maksimaalsest vastusest (20 % inhibeerimine).

▼**M8**

IC_{50} = aine kontsentratsioon, mille juures täheldati 50 % selle maksimaalsest vastusest (50 % inhibeerimine).

PC_{80} = uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures vastus on võrdne etalonaine IC_{20} väärtusega.

PC_{50} = uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures vastus on võrdne etalonaine IC_{50} väärtusega.

TCx_{min} = uuritava kemikaali minimaalne suhteline induktsioon.

Uuritavate kemikaalide puhul ei ole näiteks tsütotoksilisuse või lahustuvusprobleemide tõttu võimalik alati täielikku doosi-vastuse kõverat leida. Sel juhul ei saa IC_{50}, IC_{20} ja PC_{50} leida. Siis saab leida üksnes PC_{20} ja TC_{min}.

58. Tulemused peavad põhinema kahel (või kolmel) sõltumatul katsel. Kui kaks katset annavad võrreldavad ja seega korratavad tulemused, ei ole kolmandat katset vaja teha. Selleks, et olla vastuvõetavad, peavad tulemused:

— vastama nõuetekohasuse kriteeriumidele (vt nõuetekohasuse kriteeriumid punktides 14-22),

— olema korratavad.

Andmete tõlgendamise kriteeriumid

59. Andmete tõlgendamiseks ja otsustamiseks, kas uuritav kemikaal lugeda positiivseks või negatiivseks, kasutatakse järgmisi kriteeriume.

Agonism

Iga tervikkatse korral loetakse uuritav kemikaal **positiivseks**, kui:

1. TC_{max} on suurem kui 10 % etalonainega (REF_{10}) saadud maksimaalsest vastusest või sellega võrdne.

2. Vähemalt kaks uuritava kemikaali kontsentratsiooniga saadud tulemust on suuremad kui REF_{10} või sellega võrdsed.

Iga tervikkatse korral loetakse uuritav kemikaal **negatiivseks**, kui:

1. TC_{max} ei ületa 10 % etalonainega (REF_{10}) saadud maksimaalsest vastusest.

2. Vähem kui kahe uuritava kemikaali kontsentratsiooniga saadud tulemused on suuremad kui REF_{10} või sellega võrdsed.

Antagonism

Iga tervikkatse korral loetakse uuritav kemikaal **positiivseks**, kui:

1. TC_{min} on väiksem kui 80 % etalonainega (REF_{80} = 20 % inhibeerimine) saadud maksimaalsest vastusest või sellega võrdne.

2. Vähemalt kaks uuritava kemikaali kontsentratsiooniga saadud tulemust on väiksemad kui REF_{80} või sellega võrdsed.

▼**M8**

Iga tervikkatse korral loetakse uuritav kemikaal **negatiivseks**, kui:

1. TC_{min} on suurem kui 80 % etalonainega (REF_{80} = 20 % inhibeerimine) saadud maksimaalsest vastusest.

2. Vähem kui kahe uuritava kemikaali kontsentratsiooniga saadud tulemused on väiksemad kui REF_{80} või sellega võrdsed.

60. Selleks, et iseloomustada uuritava kemikaali võimet kutsuda esile positiivset vastust, tuleb katseprotokolli kanda toime suurusjärk (agonism: TC_{max}; antagonism: TC_{min}) ning kontsentratsioon, mille juures toime avaldub (agonism: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonism: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

KATSEPROTOKOLL

61. Vt punkti 20 jaotises „ER TA katsemeetodi osad“.

KIRJANDUS

(1) OECD (2016), „Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential“, Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(2) Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A., Brouwer, A., van der Burg, B. (2005), „Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays“, *Toxicol Sci.*, nr 83(1), lk 136–148.

(3) Quaedackers, M. E., van den Brink, C. E., Wissink, S., Schreurs, R. H. M. M., Gustafsson, J. A., van der Saag, P. T. ja van der Burg, B. (2001), „4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ“, *Endocrinology*, nr 142(3), lk 1156–1166.

(4) Thorne, N., Inglese, J. ja Auld, D. S. (2010), „Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology“, *Chemistry and Biology*, nr 17(6), lk 646–57.

(5) Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J. P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J. C., Cavaillès, V. ja Balaguer, P.(2006), „Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta“, *Biochem. Pharmacol.,* nr 71, lk 1459–1469.

(6) Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. ja Gustafsson, J. A. (1998), „Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta“, *Endocrinol.,* nr 139, lk 4252–4263.

(7) Sotoca, A. M., Bovee, T. F. H., Brand, W., Velikova, N., Boeren, S., Murk, A.J., Vervoort, J., Rietjens, I. M. C. M. (2010), „Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism“, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* nr 122, lk 204–211.

(8) Sonneveld, E., Riteco, J. A. C., Jansen, H. J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W. G. ja van der Burg, B. (2006), „Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities“, *Toxicol. Sci.,* nr 89(1), lk 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. ja Ishii, H. (1995), „Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products“, *J. Vet. Med. Sci.,* nr 57(4), lk 769–771.

(10) Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y. ja Oldenburg, K. R. (1999), „A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays“, *J. Biomol. Scr.*, nr 4, lk 67–73.

(11) Besselink, H., Middelhof, I. ja Felzel, E. (2014), „Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells“. BioDetection Systems BV (BDS), Amsterdam, Madalmaad.

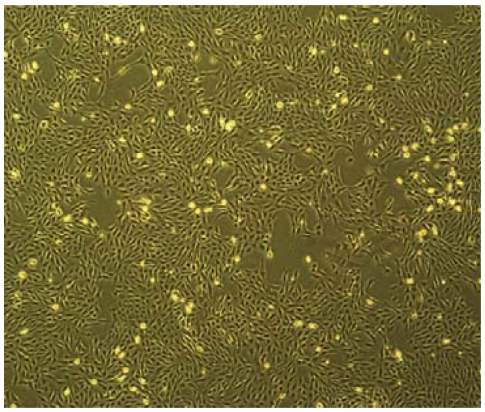
▼**M8**

Liide 4.1

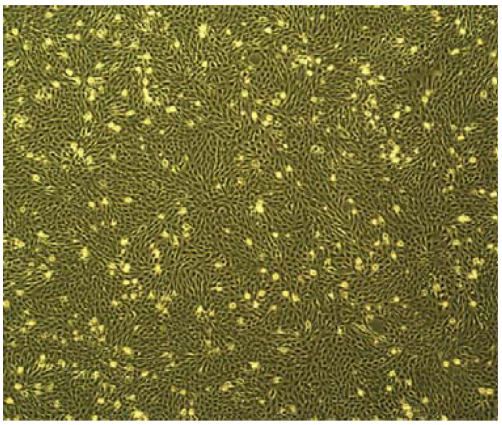
RAKKUDE ELUVÕIMELISUSE VISUAALNE KONTROLL



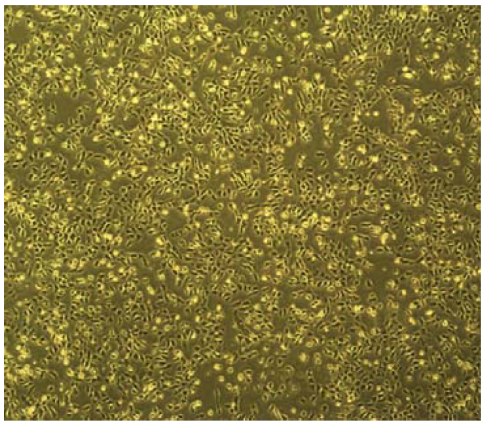
Konfluentsus < 5 %. Rakud on äsja külvatud. Rakkude eluvõimelisus 100 %. Klassifikatsioon: tsütotoksilisus puudub.



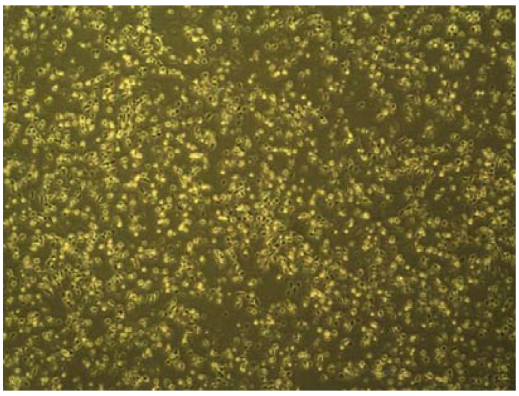
Konfluentsus > 85 %. Selles etapis töödeldakse rakke uuritavate kemikaalidega. Rakkude eluvõimelisus > 95 %.
Klassifikatsioon: tsütotoksilisus puudub.



Konfluentsus > 95 %. Rakud on tihedalt koos ja hakkavad suurenema. Rakkude eluvõimelisus > 95 %.
Klassifikatsioon: tsütotoksilisus puudub.



Rakkude eluvõimelisus < 25 %. Rakud eemalduvad üksteisest ja kontakt nende vahel väheneb. Rakud on ümardunud. Klassifikatsioon: tsütotoksilisus.



Rakkude eluvõimelisus < 5 %. Rakud on üksteisest täielikult eemaldunud ja kontakt nende vahel on kadunud. Rakud on ümardunud. Klassifikatsioon: tsütotoksilisus.

▼M8

B.67. **TÜMIDIINI KINAASI GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO* GEENIMUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 490 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi ja täiendatakse, et võtta arvesse teaduse arengut, regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Hiire lümfoomi katse (MLA) ja TK6-katse, milles kasutatakse tümidiini kinaasi (TK) lookust, olid varem hõlmatud katsemeetodiga B.17. Genotoksilisuse uuringute rahvusvahelise seminari (IWGT) MLA ekspertide töörühm on välja töötanud rahvusvaheliselt ühtlustatud soovitused katsemeetodi nõuetekohasuse kriteeriumide ja andmete tõlgendamise kohta MLA korral (1, 2, 3, 4, 5) ja need soovitused on hõlmatud käesoleva uue katsemeetodiga B.67. Käesoleva katsemeetod on kirjutatud MLA jaoks, samuti TK6-katse jaoks, kuna viimases kasutatakse samuti TK lookust. Kuigi MLAd on regulatiivsel eesmärgil laialdaselt kasutatud, on TK6 kasutus palju harvem. Näitajate sarnasusest hoolimata ei ole kaks rakuliini üksteisega asendatavad ning regulatiivsetes kavades võidakse õiguspäraselt väljendada konkreetse regulatiivse eesmärgiga seoses eelistust ühe või teise katse suhtes. Näiteks on MLA valideerimine tõendanud selle sobivust mitte üksnes geenimutatsioonide tuvastamiseks, vaid ka selle kindlakstegemiseks, kas uuritav kemikaal võib indutseerida struktuurse kromosoomiaberratsiooni. Käesolev katsemeetod kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (6).

2. Käesoleva meetodi kohaste imetajarakkudega läbi viidavate *in vitro* geenimutatsioonikatsete eesmärk on tuvastada kemikaalide põhjustatud geenimutatsioone. Kõnealustes katsetes kasutatakse rakuliine, mis võimaldavad tuvastada otsemutatsioone reportergeenides, täpsemalt endogeenses tümidiini kinaasi geenis (inimese rakkudes *TK* ja näriliserakkudes *Tk*, käesolevas katsemeetodis viidatakse neile koos kui geenile *TK*). Käesolev katsemeetod on ette nähtud kasutamiseks kahe rakuliiniga: hiire lümfoomi rakuliin the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (üldise nimetusega L5178Y) ja inimese lümfoblastoidi rakuliin TK6 (üldise nimetusega TK6). Kuigi kahe rakuliini päritolu, rakkude kasvamine, p53-staatus jms varieerub, saab TK-geenimutatsioonikatsed mõlema rakutüübiga läbi viia sarnasel viisil, nagu käesolevas katsemeetodis kirjeldatud.

3. Tümidiini kinaasi geeni autosoomsus ja heterosügootsus võimaldavad tuvastada eluvõimelisi kolooniaid, mille rakkudel esineb ensüümi tümidiini kinaasi defitsiit mutatsiooni $TK^{+/-}$ –> $TK^{-/-}$ tagajärjel. Kõnealune defitsiit võib olla *TK*-geeni mõjutavate sündmuste tagajärg, kusjuures sündmusteks võivad olla nii geenimutatsioonid (punktmutatsioonid, raaminihkemutatsioonid, väikesed deletsioonid jms) kui ka kromosoomidega toimuvad sündmused (suured deletsioonid, kromosoommutatsioonid ja mitootiline rekombinatsioon). Viimased sündmused väljenduvad heterosügootsuse kaoga, mis on tuumorsupressorgeeni tavaline geneetiline muutus inimesel kasvaja tekke puhul. Teoreetiliselt saab MLAga tuvastada mitoosikäävi kahjustusest ja/või mitootilisest mittelahknemisest põhjustatud terve *TK*-geeni kandva kromosoomi kadu. Kombineeritud tsütogeneetiline ja molekulaaranalüüs näitavad tõepoolest selgesti, et MLA TK-mutandid on mittelahknemise tagajärg. Kuid tõendite kaalukusest nähtub, et *TK*-geenimutatsioonikatsetega ei ole võimalik usaldusväärselt tuvastada aneugeene, kui kohaldatakse standardseid tsütotoksilisuse kriteeriume (nagu käesolevas katsemeetodis kirjeldatud), ning seetõttu ei sobi nimetatud katsed aneugeenide tuvastamiseks (7, 8, 9).

▼**M8**

4. *TK*-geenimutatsioonikatsetes luuakse kaks erinevat *TK*-mutantide fenotüübiklassi; normaalse kasvuga mutandid, mis kasvavad sama kiirusega nagu TK heterosügootsed rakud, ning aeglase kasvuga mutandid, mille kasvamisel on populatsiooni kahekordistumisaeg pikenenud. Normaalse kasvuga ja aeglase kasvuga mutante nimetatakse MLA korral suurte kolooniate ja väikeste kolooniatega mutantideks ning TK6 korral vara tekkivate kolooniate ja hilja tekkivate kolooniatega mutantideks. Nii suurte kui ka väikeste kolooniatega MLA mutantide molekulaarset ja tsütogeneetilist olemust on uuritud täpsemalt (8, 10, 11, 12, 13). Vara tekkivate kolooniate ja hilja tekkivate kolooniatega TK6 mutantide molekulaarset ja tsütogeneetilist olemust on samuti täpsemalt uuritud (14, 15, 16, 17). Mõlemat tüüpi rakkude aeglase kasvuga mutandid on saanud geneetilise kahjustuse, mis hõlmab oletatavat/oletatavaid kasvu regulaatorgeeni või -geene *TK*-lookuse lähedal, mille tulemusena kahekordistumise aeg pikeneb ja kolooniad moodustuvad hiljem või on väikesed (18). Aeglase kasvuga mutantide tekkimist on seostatud kemikaalidega, mis põhjustavad suuri struktuurimuutusi kromosoomi tasandil. Rakud, mille kahjustus ei hõlma oletatavat/oletatavaid kasvu regulaatorgeeni või -geene *TK*-lookuse lähedal, kasvavad vanemrakkudele sarnase kiirusega ja neist saavad normaalse kasvuga mutandid. Peamiselt normaalse kasvuga mutantide tekkimist on seostatud kemikaalidega, mis toimivad peamiselt punktmutageenidena. Sellest tulenevalt on oluline loendada nii aeglase kui ka normaalse kasvuga mutante, et leida kõik mutandid ja saada ülevaade uuritava kemikaali põhjustatud kahjustuste liigist või liikidest (mutageenid *vs.* klastogeenid) (10, 12, 18, 19).

5. Katsemeetod on koostatud nii, et see annaks üldist teavet nii MLA kui ka TK6 kohta ning spetsiifilisi suuniseid kummagi katse kohta eraldi.

6. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

7. *In vitro* katsete puhul tuleb metabolismi aktiveerimiseks üldjuhul kasutada eksogeenset allikat. Eksogeenne metabolismi aktiveerimise süsteem ei võimalda täielikult matkida *in vivo* tingimusi.

8. Tuleks hoiduda kasutamast tingimusi, mille puhul võib saada valepositiivseid tulemusi, mis ei ole põhjustatud uuritava kemikaali interaktsioonist raku geneetilise materjaliga (st võib esineda vastastikmõju katsesüsteemiga); sellised tingimused hõlmavad pH või osmolaalsuse muutusi, söötme koostisosadega reageerimist (20, 21) või liiga suurt tsütotoksilisust (22, 23, 24). MLA ja TK6-katse puhul loetakse liiga suureks tsütotoksilisuseks punktis 28 määratletud soovitatavat suurimat tsütotoksilisuse määra ületavat tsütotoksilisust. Lisaks tuleb tähelepanu pöörata sellele, et uuritavad kemikaalid, mis on tümidiini analoogid või käituvad sellisena, võivad raku töötlemise ajal suurendada muteerumissagedust muude spontaansete mutantide selektiivse kasvu teel ning nende nõuetekohaseks hindamiseks tuleb kasutada täiendavaid katsemeetodeid (25).

9. Tehislike nanomaterjalide uurimiseks võib olla vaja käesolevat katsemeetodit kohandada, kuid neid kohandusi ei ole käesolevas katsemeetodis kirjeldatud.

10. Enne kui kasutada käesolevat meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

▼**M8**

11. Muteerunud rakud, millel *TK*$^{+/-}$ —> *TK*$^{-/-}$-mutatsiooni tulemusel puudub ensüümi tümidiini kinaasi aktiivsus, on resistentsed pürimidiini analoogi trifluorotümidiini (TFT) tsütotoksiliste mõjude suhtes. Rakud, kus on olemas *TK*, on tundlikud TFT suhtes, mis pärsib rakkude ainevahetust ja peatab rakkude edasise jagunemise. Seega on muteerunud rakud võimelised TFT juuresolekul paljunema ja nähtavaid kolooniaid moodustama, kuid ensüümi *TK* sisaldavad rakud seda ei suuda.

KATSE PÕHIMÕTE

12. Rakususpensioon viiakse sobivaks ajavahemikuks (vt punkt 33) kokkupuutesse uuritava kemikaaliga – nii koos metabolismi aktiveeriva eksogeense allikaga kui ka ilma selleta (vt punkt 19) – ning seejärel külvatakse rakud ümber, et hinnata tsütotoksilisust ja võimaldada fenotüübi avaldumist enne mutantide selekteerimist. Tsütotoksilisuse hindamiseks kasutatakse MLA korral suhtelist kogukasvu (vt punkt 25) ja TK6 korral suhtelist ellujäämust (vt punkt 26). Töödeldud kultuure hoitakse söötmes piisava aja jooksul, mis on iseloomulik igale rakutüübile (vt punkt 37), võimaldamaks saavutatud mutatsioonide fenotüüpide avaldumist võimalikult lähedal optimaalsele tasemele. Fenotüübi avaldumise järgselt külvatakse teadaolev arv rakke muteerumissageduse määramiseks nii söötmesse, mis sisaldab muteerunud kolooniate tuvastamist võimaldavat selektiivainet, kui ka selektiivaineta söötmesse, et teha kindlaks kloonimistõhusus (eluvõimelisus). Sobiva inkubatsiooniperioodi lõppedes kolooniad loendatakse. Muteerumissagedus arvutatakse muteerunud kolooniate arvu põhjal, mida on korrigeeritud lähtuvalt kloonimistõhusest mutantide selekteerimise ajal.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Rakud

13. MLA korral: kuna MLA on välja töötatud L5178Y rakkude alaliini *TK*$^{+/-}$-3.7.2C kasutades ning selle kasutamine seda katsemeetodit iseloomustab, tuleb MLA korral kasutada seda konkreetset alaliini. Rakuliin L5178Y on saadud DBA-2 hiire tüümuse lümfoomist, mille on esile kutsunud metüülkolantreen (26). Clive ja kaastöötajad töötlesid L5178Y rakke (Clive'i tähistus TK$^{+/+}$ -3) etüülmetaansulfonaadiga ja eraldasid TK$^{-/-}$ (tähistus TK$^{-/-}$-3.7) klooni, kasutades selektiivainena bromodeoksüuridiini. TK$^{-/-}$ kloonist eraldati spontaanne TK$^{+/-}$ kloon (tähistus TK$^{+/-}$ -3.7.2.) ja alamkloon (tähistus TK$^{+/-}$-3.7.2C) ning iseloomustati neid MLAs kasutamiseks sobivana (27). Rakuliini karüotüüp on avaldatud (28, 29, 30, 31). Modaalne kromosoomiarv on 40. Leidub üks metatsentrilinekromosoom (t12;13), mis tuleb loendada ühe kromosoomina. Hiire *TK* lookus asub kromosoomi 11 distaalses otsas. Rakuliinil L5178Y *TK*$^{+/-}$ -3.7.2C on mutatsioonid mõlemas p53 alleelis ning see toodab muteerunud p53 valku (32, 33). TK$^{+/-}$-3.7.2C rakuliini p53 seisund mõjutab tõenäoliselt seda, kuidas on katsega võimalik tuvastada ulatuslikke kahjustusi (17).

14. TK6 korral: TK6 on inimese lümfoblastoidi rakuliin. Vanemrakuliin on Epstein-Barri viiruse toimel transformeerunud rakuliin WI-L2, mis algselt saadi päriliku sferotsütoosiga 5aastaselt meesisikult. Esimene isoleeritud kloon HH4 mutageniseeriti ICR191ga ja saadi *TK* heterosügootne rakuliin TK6 (34). TK6 rakud on peaaegu diploidsed ja esindav karüotüüp on 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Inimese *TK* lookus asub kromosoomi 17 pikas õlas. TK6 on p53 sisaldav rakuliin, sest selle mõlemas alleelis on metsiktüüpi p53 järjestus ning see ekspresseerib üksnes metsiktüüpi p53 valku (36).

▼M8

15. Nii MLA kui ka TK6 puhul on soovitatav, et katselabor rakkude tüvikultuuri luues või uuendades veenduks *Mycoplasma* puudumises, kontrolliks rakkude karüotüüpi või värviks *TK* lookusega kromosoomid ning kontrolliks populatsiooni kahekordistumise aegu. Katselaboris kasutatavate rakkude puhul tuleb teha kindlaks normaalne rakutsükliks kuluv aeg ja see peab vastama rakkude kohta avaldatud iseloomulikele näitajatele (16, 19, 37). Tüvikultuuri säilitatakse –150 °C juures või madalamal temperatuuril ning kasutatakse kõigi rakkude töökultuuride valmistamiseks.

16. Enne suure hulga krüosäilitatud töökultuuride valmistamist või otse enne katses kasutamist võib olla vajalik puhastada kultuur eelnevalt leiduvatest muteerunud rakkudest (kui lahusti kontrollproovi muteerumissagedus (MF) jääb juba lubatavatesse piiridesse – vt tabel 2 MLA kohta). Selleks kasutatakse metotreksaati (aminopteriini), et selekteerida rakud, mis ei ole TK defitsiidiga, ning lisatakse kultuurile tümidiini, hüpoksantiini ja glütsiini (L5178Y) või 2'-deoksütsütidiini (TK6), et tagada TK sisaldusega rakkude optimaalne kasv (19, 38, 39) (ja TK6 kohta (40)). Üldised nõuanded rakukultuuride säilitamise hea tava kohta ning konkreetsed nõuanded L5178Y ja TK6 rakkude kohta on esitatud allikates (19, 31, 37, 39, 41). Laboritele, kus on vaja tüvikultuure MLA või TK6 alustamiseks või uusi tüvikultuure, on ligipääsetav hästi iseloomustatud rakkudega rakupank (37).

Söötmed ja kultiveerimistingimused

17. Mõlema katsemeetodi korral tuleks rakukultuuride kasvatamisel kasutada sobivat söödet ja sobivaid inkubeerimistingimusi (nt kasvunõud, 5 % CO_2-sisaldusega niiske atmosfäär, inkubeerimistemperatuur 37 °C). Kultiveerimisel tuleks alati järgida tingimusi, millega tagatakse rakkude püsimine logaritmilises kasvufaasis. On väga oluline valida söötmed ja kasvutingimused nii, et oleks tagatud rakkude optimaalne kasv ekspressiooniperioodil ning optimaalne kloonimine nii muteerunud kui ka muteerumata rakkude puhul. MLA ja TK6 korral on oluline ka see, et kultiveerimistingimused tagaksid nii suurte / vara tekkivate kolooniatega kui ka väikeste / hilja tekkivate kolooniatega Tk mutantide optimaalse kasvu. Rohkem üksikasju kultiveerimise, kaasa arvatud vajaduse kohta hobuseseerum soojusega korralikult inaktiveerida, kui kasutatakse RPMI söödet, on leitavad allikatest (19, 31, 38, 39, 40, 42).

Rakukultuuride ettevalmistamine

18. Rakkude paljundamiseks tüvikultuurist külvatakse need söötmesse sellise tihedusega, et rakkude eksponentsiaalne kasv suspensioonis jätkuks kogu töötlemis- ja ekspressiooniperioodi vältel.

Metabolismi aktiveerimine

19. L5178Y jaTK6 rakkude kasutamise korral tuleks kasutada eksogeenseid metabolismisüsteeme, sest nende rakkude endogeenne metaboliseerimisvõime on ebapiisav. Kui ei ole teisiti põhjendatud, soovitatakse vaikevalikuna kõige sagedamini kasutatavat süsteemi, milleks on näriliste (tavaliselt roti) maksast valmistatud postmitokondriline fraktsioon S9, millele on lisatud kofaktor ning mida on töödeldud ensüümide induktoritega, nagu Aroclor 1254 (43, 44, 45) või fenobarbitaali ja β-naftoflavooni kombinatsiooniga (46, 47, 48, 49, 50, 51). Viimati nimetatud kombinatsiooni kasutamine ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (52) ning seeon osutunud segafunktsiooniga oksüdaaside induktorina sama

▼M8

tõhusaks kui Aroclor 1254 (45, 46, 47, 48, 49). S9-fraktsiooni kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonivahemikus 1–2 % (mahuprotsent), kuid lõplikus katsesöötmes võib kontsentratsiooni suurendada kuni 10 %-ni (mahuprotsent). Kasutatava eksogeense metabolismi aktiveerimise süsteemi või ensüümiinduktori liigi ja kontsentratsiooni valikut võib mõjutada uuritava kemikaali klass.

Uuritava kemikaali ettevalmistamine

20. Enne rakkude töötlemist tuleks tahke uuritav kemikaal lahustada sobivas lahustis ja vajaduse korral tuleks saadud lahust lahjendada (vt punkt 21). Vedelat uuritavat kemikaali võib lisada otse katsesüsteemi või seda enne lisamist lahjendada. Gaasilise või lenduva kemikaali kasutamisel tuleks standardmeetodit asjakohaselt muuta, näiteks viia kemikaaliga töötlemine läbi suletud kultiveerimisnõus (53, 54, 55). Uuritav kemikaal tuleks katseks ette valmistada vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui püsivuse andmetest nähtub, et kemikaali säilitamine on vastuvõetav.

KATSETINGIMUSED

Lahustid

21. Lahusti tuleks valida nii, et oleks tagatud uuritava kemikaali optimaalne lahustumine, kuid lahusti ei mõjutaks samal ajal negatiivselt katse käiku näiteks rakkude kasvukiiruse või uuritava kemikaali omaduste muutmise, kultiveerimisnõuga reageerimise või metabolismi aktiveerimise süsteemi kahjustamise teel. Esmajärjekorras soovitatakse võimaluse korral kaaluda veepõhise lahusti (või söötme) kasutamist. Tavalised lahustid on näiteks vesi või dimetüülsulfoksiid. Üldjuhul ei tohiks töötlusetapis kasutatavas lõppsöötmes orgaanilise lahusti sisaldus ületada 1 % (mahuprotsent) ja veepõhise lahusti (füsioloogiline lahus või vesi) sisaldus ei tohiks ületada 10 % (mahuprotsent). Kui kasutatakse muid kui tavaliselt kasutatavaid lahusteid (nt etanooli või atsetooni), tuleb nende kasutamiseks esitada andmed, millest nähtub nende kokkusobivus uuritava kemikaali ja katsesüsteemiga ning genotoksilise toime puudumine kasutatava kontsentratsiooni juures. Selliste tõendavate andmete puudumisel on oluline lisada katsesse kemikaaliga töötlemata kontrollproovid (vt 1. liide, määratlused), et tõendada valitud lahustist tuleneva kahjuliku või mutageense toime puudumist.

TSÜTOTOKSILISUSE MÕÕTMINE JA TÖÖTLEMISKONTSENTRATSIOONIDE VALIMINE

22. Uuritava kemikaali suurima kontsentratsiooni valimisel tuleks hoiduda valimast kontsentratsiooni, mille puhul on võimalik saada valepositiivseid tulemusi, näiteks tulenevalt liiga suurest tsütotoksilisusest (vt punkt 28), söötmes sadenemisest (vt punkt 29) või pH või osmolaalsuse olulisest muutumisest (vt punkt 8). Kui uuritav kemikaal muudab lisamise hetkel oluliselt söötme pH-d, võib pH reguleerimiseks lisada töötlemiseks kasutatavasse lõppsöötmesse puhvrit, et hoida ära valepositiivsete tulemuste saamist ja säilitada sobivad kultiveerimistingimused.

23. Kontsentratsioonide valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest ja muudest kaalutlustest (vt punktid 27–30). Ehkki tsütotoksilisuse hindamine eelkatses võib põhikatses kasutatavate kontsentratsioonide täpsemaks kindlakstegemiseks kasulikuks osutuda, ei ole eelkatse tegemine kohustuslik. Põhikatses on tsütotoksilisuse mõõtmine igas kultuuris vajalik ka juhul, kui tsütotoksilisust on eelnevalt juba hinnatud. Kui tehakse vahemiku leidmise katse, peab see hõlmama suurt kontsentratsioonide vahemikku ning selle võib lõpetada kas 1. päeval pärast töötlemist või pikendada seda ekspresseerimiseni ja mutantide selekteerimiseni 2. päeval (kui selgub, et kasutatavad kontsentratsioonid on selleks sobivad).

▼**M8**

24. Tsütotoksilisust tuleks määrata iga üksiku katsekultuuri ja kontrollkultuuri puhul: MLA (2) ja TK6 (15) korral kasutatavad meetodid on määratletud rahvusvaheliselt kokkulepitud tavaga.

25. Nii MLA agari- kui ka mikrotiiterplaadi variandi korral: tsütotoksilisuse hindamiseks tuleks kasutada suhtelist kogukasvu, mille määratlesid esmakordselt Clive ja Spector 1975. aastal (2). See näitaja hõlmab suhtelist suspensioonikasvu (katsekultuur *vs*. lahusti kontrollproov) rakkude töötlemise ajal, ekspresseerimisaega ja kloonimise suhtelist tõhusust (katsekultuur *vs*. lahusti kontrollproov) mutantide selekteerimise ajal (2). Tuleks võtta arvesse, et suhteline suspensioonikasv hõlmab igasugust rakkude arvu võimalikku vähenemist, mis töötlemise ajal katsekultuuris tekib (vt valemid 2. liites).

26. TK6 korral: tsütotoksilisuse hindamiseks tuleks kasutada suhtelist ellujäämust, st võrrelda vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusust, mida on kohandatud rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise ajal, negatiivsete kontrollproovidega, mille ellujäämuseks loetakse 100 % (vt valem 2. liites).

27. Kemikaali tuleks hinnata vähemalt neljal nõuetekohasuse kriteeriumidele (sobiv tsütotoksilisuse määr, rakkude arv jne) vastaval katsekontsentratsioonil (see ei hõlma lahusti kontrollproovi ega positiivseid kontrollproove). Katse läbiviimisel on soovitatav kasutada iga katsekontsentratsiooni puhul kahte paralleelkultuuri, ent võib kasutada ka suuremat arvu paralleelkultuure või ühteainsat kultuuri. Iga kontsentratsiooni puhul tuleks paralleelkultuuridega saadud tulemused esitada eraldi, kuid andmeanalüüsi jaoks võib need koondada (55). Uuritavate kemikaalide puhul, mille tsütotoksilisus on väike või millel see puudub, sobivad tavaliselt kontsentratsioonid, mis erinevad üksteisest umbes kaks kuni kolm korda. Tsütotoksilisuse avaldumise korral, tuleb kontsentratsioonid valida nii, et need kataksid tsütotoksilisuse vahemiku alates kontsentratsioonist, mille juures avaldub tsütotoksilisus (nagu on kirjeldatud punktis 28), ja hõlmama kontsentratsioonid, mille juures esineb mõõdukas ja väike (või olematu) tsütotoksilisus. Paljudel uuritavatel kemikaalidel on kontsentratsiooni-vastuse kõver järsu tõusuga ning tsütotoksilisuse täieliku vahemiku katmiseks või kontsentratsioonist-vastuse sõltuvuse üksikasjalikuks uurimiseks võib olla vaja kasutada üksteisest vähem erinevaid kontsentratsioone ja enam kui nelja kontsentratsiooni, eriti olukorras, kus on vaja teha korduskatse (vt punkt 70). Enam kui nelja kontsentratsiooni kasutamine võib osutuda eriti oluliseks, kui kasutatakse ühteainsat kultuuri.

28. Kui suurima kontsentratsiooni valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest, tuleks suurim kontsentratsioon valida nii, et MLA puhul saavutataks suhteline kogukasv 10–20 % ning TK6 puhul suhteline ellujäämus 10–20 % (punkt 67).

29. Raskesti lahustuva uuritava kemikaali puhul, mis ei ole tsütotoksiline kontsentratsioonidel, mis on väiksemad kui vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, peaks suurimal analüüsitaval kontsentratsioonil olema pärast uuritava kemikaaliga töötlemise lõppemist täheldatav hägusus või silma või invertmikroskoobiga nähtav sade. Isegi kui tsütotoksilisus avaldub suuremal kontsentratsioonil kui vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, on soovitatav teha katse ainult ühe sellise kontsentratsiooniga, mille juures tekib hägusus või nähtav sade, sest sade võib toimet moonutada. Kuna MLA ja TK6 korral kasutatakse suspendeeritud kultuure, tuleb eriti hoolikalt veenduda, et sade ei mõjuta katse käiku. Enne katse alustamist võib olla kasulik määrata ka kemikaali lahustuvus söötmes.

▼M8

30. Kui ei täheldata ei sadet ega liigset tsütotoksilisust, peaks suurim katsekontsentratsioon olema vähim järgmistest kontsentratsioonidest: 10 mM, 2 mg/ml või 2 µl/ml (57, 58). Kui uuritava kemikaali koostis ei ole määratav, näiteks kui see on tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB), keskkonnast saadud ekstrakt vms, võib juhul, kui ei täheldata kemikaali piisavat tsütotoksilisust, olla vaja selle iga koostisosa kontsentratsiooni suurendamiseks kasutada suuremat maksimumkontsentratsiooni (nt 5 mg/ml). Tuleks siiski märkida, et inimravimite puhul võivad need nõuded olla teistsugused (59).

Kontrollproovid

31. Iga katserežiimi puhul tuleks kasutada paralleelseid negatiivseid kontrollproove (vt punkt 21), mis koosnevad üksnes töötlemiseks kasutatavale söötmele lisatud lahustist ja mida käideldakse samamoodi kui töödeldud kultuure.

32. Paralleelseid positiivseid kontrollproove on vaja, et tõendada labori pädevust kasutatud katsemetoodika tingimustel määrata mutageene ja eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhusust (kui asjakohane) ning tõendada suutlikkust nii väikeste / hilja tekkivate kui ka suure / vara tekkivate *TK* mutantide piisaval tuvastamisel. Positiivsete kontrollainete näited on esitatud allpool tabelis 1. Kui see on põhjendatud, võib positiivse kontrollainena kasutada mõnda muud ainet. Kuna *in vitro* genotoksilisuse katsed imetajarakkudega on piisavalt standarditud lühiajaliste (3–4 tundi) töötluste puhul, mis tehakse paralleelkatsetena metaboolse aktivatsiooniga või ilma selleta, kasutades sama kestusega töötlust, võib positiivse kontrollproovi osas piirduda metaboolset aktiveerimist vajava mutageeniga. Sel juhul võimaldab üheainsa kõnealuse positiivse kontrollprooviga saadud tulemus tõendada nii metabolismi aktiveerimise süsteemi toimimist kui ka katsesüsteemi reageerimisvõimet. Pikaajalise töötluse jaoks (st 24 tundi ilma S9-fraktsioonita), kui seda kasutatakse, peab siiski olema oma positiivne kontrollproov, sest töötluse kestus erineb sellest, mida kasutatakse metaboolse aktivatsiooniga katses. Iga positiivset kontrollainet puhul tuleks kasutada ühes või mitmes kontsentratsioonis, mille juures võib eeldada, et saadakse korratavad ja tuvastatavad, tausttaset ületavad tulemused, mis võimaldavad tõendada katsesüsteemi tundlikkust, ning samal ajal ei tohiks tulemused olla mõjutatud käesolevas katsemeetodis sätestatud piirmäära ületavast tsütotoksilisusest (vt punkt 28).

Tabel 1

Labori pädevuse hindamiseks ja positiivsete kontrollainete valimiseks soovitatavad etalonained

Kategooria	Aine	CASi nr
1. Metaboolse aktivatsioonita toimivad mutageenid		
	Metüülmetaansulfonaat	66-27-3
	Mitomütsiin C	50-07-7
	4-nitrokinoliin-*N*-oksiid	56-57-5
2. Metaboolset aktivatsiooni vajavad mutageenid		
	Benso[*a*]püree	50-32-8
	Tsüklofosfamiid (monohüdraat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetüülbensantratseen	57-97-6
	3-metüülkolantreen	56-49-5

▼M8

METOODIKA

Uuritava kemikaaliga töötlemine

33. Paljunevaid rakke töödeldakse uuritava kemikaaliga nii metabolismi aktiveerimise süsteemi juuresolekul kui ka ilma selleta. Kokkupuuteperiood peab olema sobiva pikkusega (tavaliselt piisab 3–4 tunnist). Tuleks siiski märkida, et inimravimite puhul võivad need nõuded olla teistsugused (59). Kui MLA korral annab lühiajaline töötlemine negatiivsed tulemused ja leidub teavet, mille kohaselt oleks vaja pikemat töötlemist [nt nukleosiidi analoogid, halvasti lahustuvad kemikaalid (5, 59)], tuleks kaaluda katse tegemist pikema, nt 24-tunnise töötlemisega ilma S9-fraktsioonita.

34. Rakkude minimaalse arvu valimisel iga katsekultuuri (nii kontroll- kui ka töödeldud kultuuride) ja iga katseetapi jaoks tuleks lähtuda spontaanse muteerumise sagedusest. Üldsuunisena tuleks igas katsekultuuris töödelda ja ümber külvata piisav hulk rakke, et tagada igas katseetapis (töötlemine, fenotüübi ekspressioon ja mutantide selektsioon) vähemalt 10, kuid ideaaljuhul 100 mutandi spontaanne teke (56).

35. MLA puhul on soovituslik vastuvõetav spontaanse muteerumise sagedus vahemikus 35–140 × 10^{-6} (agarivariant) ja 50–170 × 10^{-6} (mikrotiiterplaadi variant) (vt tabel 2). Selleks, et saada igas katsekultuuris vähemalt 10, kuid ideaaljuhul 100 töötluses ellujäänud, spontaanselt tekkinud mutanti, on vaja töödelda vähemalt 6 × 10^{6} rakku. Sellise arvu rakkude töötlemine ja rakkude piisava arvu tagamine ekspresseerumise ning mutantide selekteerimiseks vajaliku kloonimise etappides tagab katse igas etapis piisava arvu (10 või rohkem) spontaanselt tekkinud mutante ka juhul, kui kultuure töödeldakse kontsentratsioonidel, mis on 90 % ulatuses tsütotoksilised (mõõdetuna 10 % suhtelise kogukasvuna) (19, 38, 39).

36. TK6 korral jääb spontaanse muteerumise sagedus üldjuhul vahemikku 2–20 × 10^{-6}. Selleks, et saada igas kultuuris vähemalt 10 töötluses ellujäänud, spontaanselt tekkinud mutanti, on vaja töödelda vähemalt 20 × 10^{6} rakku. Sellise arvu rakkude töötlemine tagab piisava arvu (10 või rohkem) spontaanselt tekkinud mutante ka juhul, kui kultuure töödeldakse kontsentratsioonidel, mis on 90 % ulatuses tsütotoksilised (suhteline ellujäämus 10 %). Peale selle tuleb ekspressiooniperioodi vältel kultiveerida ja mutantide selekteerimiseks välja külvata piisaval arvul rakke (60).

Fenotüübi avaldumise aeg ning tsütotoksilisuse ja muteerumissageduse mõõtmine

37. Töötlemisperioodi lõppedes kasvatatakse rakke teatava ajavahemiku jooksul, et võimaldada äsja tekkinud mutantide fenotüübi optimaalset või sellelähedast avaldumist; ajavahemik oleneb kasutavavast rakuliinist. MLA korral on fenotüübi avaldumise periood 2 päeva. TK6 korral on fenotüübi avaldumise periood 3–4 päeva. Kui kasutatakse 24-tunnist töötlemist, algab avaldumisperiood pärast töötlemise lõppu.

38. Fenotüübi avaldumise perioodi jooksul loendatakse rakke iga päev. MLA korral kasutatakse päevaseid rakkude arve päevase suspensioonikasvu arvutamiseks. Pärast 2-päevast avaldumisperioodi suspendeeritakse rakud nii selektiivainet sisaldavas kui ka ilma selektiivaineta söötmes, et teha kindlaks mutantide arv (selekteerimisplaadid) ja kloonimistõhusus (eluvõimelisuse plaadid). MLA korral on kaks võrdselt tunnustatud meetodit mutantide selektiivseks kloonimiseks: üks pehmes agaris ja teine vedelsöötmes 96 süvendiga plaatidel (19, 38, 39). TK6 korral kloonitakse vedelsöötmetes 96 süvendiga plaatidel (16).

▼M8

39. *TK* mutantide puhul on ainus soovitatav selektiivaine trifluorotümidiin (TFT) (61).

40. MLA korral loendatakse agariplaate ja mikrotiiterplaate pärast 10–12-päevast inkubeerimist. TK6 korral loendatakse mikrotiiterplaatidel vara tekkivaid mutante 10–14 päeva möödudes. Aeglase kasvuga (hilja tekkivate) TK6 mutantide avastamiseks on vaja rakkudele pärast vara tekkivate mutantide loendamist lisada söödet ja TFT-d ning inkubeerida plaate veel 7–10 päeva (62). Punktides 42 ja 44 on arutletud aeglase ja normaalse kasvuga *TK* mutantide loendamise üle.

41. MLA puhul sobivad, mõlemat meetodit (agar ja mikrotiiterplaat) hõlmavad arvutused on esitatud 2. liites. Muteerumissageduse arvutamiseks MLA agarimeetodi korral loendatakse kolooniad ja kohandatakse mutantide kolooniate arvu kloonimistõhususe järgi. MLA ja TK6 mikrotiiterplaadimeetodi korral tehakse kloonimistõhusus nii selekteerimis- kui ka kloonimistõhususe plaatidel kindlaks vastavalt Poissoni jaotusele (63). Muteerumissagedus arvutatakse nende kahe kloonimistõhususe alusel.

Mutantide kolooniate iseloomustamine

42. Kui MLA meetodil uuritav kemikaal on positiivne (vt punktid 62–63), tuleks kolooniaid iseloomustada nende arvu või kasvukiirusega vähemalt ühes uuritavas kultuuris (tavaliselt suurim vastuvõetav positiivne kontsentratsioon) ning negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides. Kui uuritav kemikaal on negatiivne (vt punkt 64), tuleks mutantide kolooniaid iseloomustada nende arvuga negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides. MLA mikrotiiterplaadimeetodi korral määratletakse väikese kolooniaga mutandid kui mutandid, mis katavad alla 25 % süvendi diameetrist, ja suure kolooniaga mutandid kui mutandid, mis katavad üle 25 % süvendi diameetrist. Agarimeetodi korral kasutatakse mutantide kolooniate loendamiseks ja suuruse määramiseks kolooniate automaatloendurit. Üksikasjalikud lähenemisviisid kolooniate suuruse määramisele on esitatud kirjandusallikates (19, 38, 40). Kolooniate iseloomustamine negatiivsetes ja positiivsete kontrollproovides on vajalik, et tõendada uuringute asjakohast läbiviimist.

43. Uuritavat kemikaali ei saa lugeda negatiivseks, kui positiivses kontrollproovis ei tuvastata piisavalt ei suure ega väikese kolooniaga mutante. Kolooniate iseloomustust võib kasutada üldise teabe saamiseks uuritava kemikaali võime kohta põhjustada punktmutatsioone ja/või kromosoomidega toimuvaid sündmusi (punkt 4).

44. TK6: Normaalse ja aeglase kasvuga mutandid eristatakse üksteisest erinevate inkubatsiooniaegade abil (vt punkt 40). TK6 puhul loendatakse üldiselt kõigis kultuurides, kaasa arvatud negatiivsetes ja positiivsete kontrollproovides nii vara kui ka hilja tekkivad mutandid. Kolooniate iseloomustamine negatiivsetes ja positiivsete kontrollproovides on vajalik, et tõendada uuringute asjakohast läbiviimist. Uuritavat kemikaali ei saa lugeda negatiivseks, kui positiivses kontrollproovis ei tuvastata piisavalt ei vara ega hilja tekkivaid mutante. Kolooniate iseloomustust võib kasutada üldise teabe saamiseks uuritava kemikaali võime kohta põhjustada punktmutatsioone ja/või kromosoomidega toimuvaid sündmusi (punkt 4).

▼M8

Labori pädevus

45. Laboris peaks enne katsemeetodi rutiinset kasutamist olema katse läbiviimiseks piisava kogemuse tõendamiseks tehtud katseseeria positiivse kontrollainena kasutatud etalonainetega, millel on eri toimemehhanismid (tabelis 1 loetletud ainete hulgast valitud ained, millest vähemalt üks vajab toimimiseks metabolismi aktiveerimist ja vähemalt üks seda ei vaja), ning mitmesuguste negatiivsete kontrollainetega (sealhulgas töötlemata kultuurid ja mitmesugused lahustid/kandeained). Selliste positiivsete ja negatiivsete kontrollainetega saadud tulemused peaksid olema kooskõlas kirjanduse andmetega. Seda nõuet ei kohaldata kogemusega laborite puhul, kui on olemas varasemate tulemuste andmebaas, nagu on määratletud punktides 47–50. MLA korral peavad nii positiivsete kui ka negatiivsete kontrollainetega saadud tulemused olema kooskõlas IWGT soovitustega (vt tabel 2).

46. Valitud positiivseid kontrollaineid (vt tabel 1) tuleks uurida nii lühiajalise kui ka pikaajalise töötlusega (kui pikaajalist töötlust kasutatakse) aktiveerimata metabolismi tingimustes ning lühiajalise töötlusega aktiveeritud metabolismi tingimustes, et tõendada mutageensete kemikaalide tuvastamise ja metabolismi aktiveerimise süsteemi tõhususe kindlakstegemise võimekust, samuti rakkude kasvutingimuste sobivust töötlemise, fenotüübi avaldumise ja mutantide selekteerimise ajal ning kasutatavate hindamismeetodite asjakohasust. Kõnealuste valitud ainete puhul tuleb katsesüsteemi tundlikkuse ja dünaamilise kasutusulatuse sobivuse tõendamiseks valida kontsentratsioonivahemikud nii, et oleks võimalik saada korratavaid, tausttaset ületavaid ja kontsentratsioonist sõltuvaid tulemusi.

Varasemad andmed kontrollproovide kohta

47. Laboris tuleks kindlaks teha:

— positiivsete kontrollainetega saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus,

— negatiivsete kontrollainetega (töötlemata rakud, lahusti kontrollproov) saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus.

48. Kui hangitakse algandmeid varasemate negatiivsete kontrollproovide tulemuste jaotuse määramiseks, peavad paralleelsete negatiivsete kontrollproovidega saadud andmed olema kooskõlas kontrollproovide kohta avaldatud andmetega. Kontrollproovidega saadud tulemuste jaotuse lähteandmetele üha uute katseandmete lisandumisel peaksid paralleelsete negatiivsete kontrollproovidega saadavad tulemused jääma ideaaljuhul selle jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 % (64, 65).

49. Laboris negatiivsete kontrollproovidega saadud varasemate tulemuste andmebaas peaks algselt hõlmama vähemalt 10 katse andmeid, kuid soovitatavalt peaks see sisaldama vähemalt 20 võrreldavates tingimustes tehtud katse andmeid. Laboris tuleks kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, näiteks kontrollkaarte (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (65)), et teha kindlaks, kui suures ulatuses positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide andmed varieeruvad, ja tõendada, et laboris kasutatav metoodika on usaldusväärne (66). Üksikasju ja soovitusi aja jooksul andmete kogumise ja kasutamise kohta võib leida kirjandusest (64).

50. Negatiivsete kontrollproovidega saadud andmed peaksid hõlmama muteerumissagedust ühes või soovitatavalt mitmes paralleelses kultuuris, nagu on kirjeldatud punktis 27. Paralleelsete negatiivsete kontrollproovide tulemused peaksid ideaaljuhul jääma labori varasemate kontrollproovi tulemuste jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %. Kui negatiivsete kontrollproovidega saadud tulemused jäävad väljapoole kõnealust usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %, võivad need olla kontrollproovidega saadud varasemate tulemuste jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmuslike võõrväärtustega ning on tõendatud, et katsesüsteem on usaldusväärne (vt punkt 49), ja puuduvad tõendid selle kohta, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksimusega.

▼M8

51. Katsemetoodika mis tahes muudatuse puhul tuleks kaaluda, kas see mõjutab katseandmete vastavust laboris kontrollproovidega varem saadud olemasolevatele andmetele. Iga olulise mittevastavuse korral tuleks luua uus kontrollproovidega saadud varasemate tulemuste andmebaas.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste esitamine

52. Nii MLA kui ka TK6 korral kuuluvad esitatavate andmete hulka nii töötlemata kui ka kontrollkultuuridega saadud andmed, mis on vajalik tsütotoksilisuse (vastavalt suhteline kogukasv või suhteline ellujäämus) ja muteerumissageduse arvutamiseks allpool kirjeldatud viisil.

53. MLA korral tuleb iga üksiku kultuuri kohta esitada suhteline suspensioonikasv, suhteline kogukasv, kloonimistõhusus mutantide selekteerimise ajal ning mutantide kolooniate arv (agarivariandi korral) või tühjade süvendite arv (mikrotiiterplaadi variandi korral). Muteerumissagedust väljendatakse mutantrakkude arvuga miljoni ellujäänud raku kohta. Kui vastus on positiivne, esitatakse väikese ja suure koloonia muteerumissagedused (ja/või protsentuaalne osakaal muteerumise üldsagedusest), mis on leitud uuritava kemikaali vähemalt ühe kontsentratsiooniga (tavaliselt suurim positiivne kontsentratsioon), negatiivse kontrollprooviga ja positiivse kontrollprooviga. Negatiivse vastuse korral tuleb esitada negatiivse kontrollproovi ja positiivse kontrollprooviga saadud väikese ja suure koloonia muteerumissagedused.

54. TK6 korral tuleb iga üksiku kultuuri kohta esitada suhteline ellujäämus, kloonimistõhusus mutantide selekteerimise ajal ning tühjade süvendite arv vara ja hilja tekkivate mutantide puhul. Muteerumissagedust väljendatakse mutantrakkude arvuga ellujäänud rakkude arvu kohta ning see peaks hõlmama muteerumise üldsagedust ning vara ja hilja tekkivate mutantide muteerumissagedust (ja/või protsentuaalselt osakaalu muteerumise üldsagedusest).

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

55. Nii MLA kui ka TK6 korral peavad enne konkreetse uuritava kemikaali üldiste tulemuste määramist olema täidetud järgmised kriteeriumid:

— katse on tehtud kahes eri tingimuses (lühiajaline töötlus metabolismi aktiveerimisega ja ilma selleta, vt punkt 33), välja arvatud juhul, kui neist ühe puhul on saadud positiivsed tulemused;

— analüüsitud rakkude ja kontsentratsioonide arv on piisav (vt punktid 27 ja 34–36);

— suurima kontsentratsiooni valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mis on kirjeldatud punktides 28–30.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollproovide nõuetekohasuse kriteeriumid

56. IWGT MLA ekspertide töörühma tehtud analüüs suure hulga MLA andmete kohta andis tulemuseks rahvusvahelise konsensuse MLA konkreetsete nõuetekohasuse kriteeriumide osas (1, 2, 3, 4, 5). Seega annab käesolev katsemeetod konkreetseid soovitusi negatiivsete ja positiivsete kontrollproovide vastuvõetavuse kindlakstegemiseks ning MLAga saadud üksikainete tulemuste hindamiseks. TK6 andmebaas on palju väiksem ja töörühm ei ole seda hinnanud.

▼M8

57. MLA korral tuleb iga katse juures hinnata, kas töötlemata/lahusti kontrollproov vastab IWGT MLA töörühma koostatud nõuetekohasuse kriteeriumidele ((4) ja tabel 2 allpool) järgmiste näitajate poolest: 1) muteerumissagedus (tuleb arvestada, et IWGT nõuetekohased muteerumissagedused on MLA agari- ja mikrotiiterplaadi variandi puhul erinevad); 2) kloonimistõhusus mutantide selekteerimise ajal ja 3) suspensioonikasv lahusti kontrollproovis (valemid on leitavad 2. liites).

Tabel 2

MLA nõuetekohasuse kriteeriumid

Näitaja	Pehme agari meetod	Mikrotiiterplaadi meetod
Muteerumissagedus:	35–140 × 10^{-6}	50–170 × 10^{-6}
Kloonimistõhusus	65–120 %	65–120 %
Suspensioonikasv	8–32-kordne (3–4-tunnine töötlus) 32–180-kordne (24-tunnine töötlus, kui seda kasutatakse)	8–32-kordne (3–4-tunnine töötlus) 32–180-kordne (24-tunnine töötlus, kui seda kasutatakse)

58. Samuti tuleb MLA korral iga katse juures hinnata, kas positiivne kontrollkatse või positiivsed kontrollkatse vastavad vähemalt ühele järgmisest kahest nõuetekohasuse kriteeriumist, mille on välja töötanud IWGT töörühm:

— positiivses kontrollproovis peab ilmnema muteerumise üldsageduse absoluutne suurenemine, st suurenemine spontaansest muteerumisest tulenevast taustsagedusest (indutseeritud muteerumissagedus) ülespoole vähemalt 300 × 10^{-6}. Vähemalt 40 % indutseeritud muteerumissagedusest peab kajastuma väikese koloonia muteerumissageduses;

— positiivses kontrollproovis peab väikese koloonia muteerumissagedus olema vähemalt 150 × 10^{-6} võrra suurem töötlemata/lahusti kontrollproovis esinevast (väikese koloonia indutseeritud muteerumissagedus 150 × 10^{-6}).

59. TK6 korral on katse nõuetekohane, kui paralleelsete negatiivsete kontrollproovide tulemused on vastuvõetavad, et lisada need labori varasemate negatiivsete kontrollproovidega saadud tulemuste andmebaasi, nagu on kirjeldatud punktides 48–49. Peale selle peavad paralleelsete positiivsete kontrollproovidega (vt punkt 32) saadud tulemused olema võrreldavad positiivsete kontrollproovidega varem saadud tulemustega ning saadud väärtused peaksid paralleelset negatiivset kontrollproovi iseloomustavate väärtustega võrreldуna olema statistiliselt oluliselt suuremad.

60. Mõlema katse korral peab positiivses kontrollkultuuris leitud tsütotoksilisus olema sama mis katsekultuurides. See tähendab, et suhteline kogukasv või suhteline ellujäämus ei tohi jääda alla 10 % Positiivse kontrollproovi vastuvõetavuse kriteeriumidele vastavuse tõendamiseks piisab ühe kontsentratsiooni kasutamisest (või kui kasutatakse rohkem kontsentratsioone, siis ühe positiivse kontrollkultuuriga kasutatava kontsentratsiooni kasutamisest). Peale selle peab positiivse kontrollproovi muteerumissagedus jääma labori jaoks määratud vastuvõetavasse vahemikku.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

61. MLA kohta on IWGT hiire lümfoomi ekspertide töörühm ära teinud olulise töö positiivse vastuse bioloogilise olulisuse ja kriteeriumidega seoses (4). Seega annab käesolev katsemeetod konkreetseid soovitusi uuritava kemikaali

▼M8

MLA-katsega saadud tulemuste tõlgendamiseks (vt punktid 62–64). TK6 andmebaas on palju väiksem ja töörühm ei ole seda hinnanud. Seepärast on TK6 puhul esitatud soovitused andmete tõlgendamiseks üldisemad (vt punktid 65–66). Täiendavad soovitused kehtivad mõlema katsemeetodi kohta (vt punktid 67–71).

MLA

62. Positiivsete ja negatiivsete vastuste määratlemiseks on soovitatav kasutada lähenemisviisi, mis tagab, et suurenenud muteerumissagedus on bioloogiliselt oluline. Muude katsete puhul tavaliselt kasutatava statistilise analüüsi asemel põhineb see lähenemisviis eelnevalt määratletud indutseeritud muteerumise sagedusel (st muteerumissageduse suurenemisel ülespoole paralleelse kontrollprooviga saadud väärtusest), mis on nimetatud globaalseks hindamisteguriks (GEF) ja mille aluseks on osalevate laborite negatiivse kontrollproovi muteerumissageduse andmete jaotuse analüüs (4). MLA agariversiooni korral on GEF 90×10^{-6} ja MLA mikrotiiterplaadi variandi korral 126×10^{-6}.

63. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui ükskõik millistel uuritud katsetingimustel (vt punkt 33) ületab muteerumissageduse kasv paralleelprooviga mõõdetud taustasageduse rohkem kui GEF võrra ning suurenemine on sõltuv kontsentratsioonist (nt kasutades trenditesti meetodit). Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama selles katsesüsteemis mutatsiooni.

64. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui kõigis uuritud katsetingimustes (vt punkt 33) puudub kontsentratsioonist sõltuv vastus või kui muteerumissagedus on suurenenud, siis see ei ületa GEFi. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama selles katsesüsteemis mutatsioone.

TK6

65. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui mis tahes uuritud katsetingimustes (vt punkt 33):

— vähemalt ühe katsekontsentratsiooni juures täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrollprooviga võrreldes;

— sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et see suurenemine on kontsentratsioonist sõltuv (vt punkt 33);

— ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrollprooviga saadud tulemuste jaotust (nt väljaspool Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %; vt punkt 48).

Kui kõik need kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama selles katsesüsteemis mutatsiooni. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud kirjanduses (66, 67).

66. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui kõikides uuritud katsetingimustes (vt punkt 33):

— ei täheldata ühegi katsekontsentratsiooni juures saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrollprooviga võrreldes;

— sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et kontsentratsioonist sõltuvat väärtuse suurenemist ei esine;

▼M8

— kõik need tulemused on labori varasemate negatiivse kontrollprooviga saadud tulemuste jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldusnivool 95 %; vt punkt 48).

67. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama selles katsesüsteemis mutatsioone.

MLA ja TK6

68. Kui suurima kontsentratsiooni valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest, tuleks suurim kontsentratsioon valida nii, et saavutataks suhteline kogukasv / suhteline ellujäämus 10–20 %. Ühine seisukoht on, et tuleb olla hoolikas niisuguste positiivsete tulemuste tõlgendamisel, mis on leitud suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 10–20 %, ning et tulemust ei loeta positiivseks, kui muteerumissageduse suurenemine ilmnes üksnes 10 % või väiksema suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse juures (kui seda hinnati) (2, 59).

69. Leidub asjaolusid, mille puhul täiendav teave võib olla abiks otsustamisel, et uuritav kemikaal ei ole mutageenne, kui ühegi kultuuriga ei saada suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse väärtust vahemikus 10–20 %. Niisugused olukorrad on järgmised: 1) tõendid mutageensuse kohta puuduvad (st puudub doosi-vastuse seos, puuduvad paralleelse negatiivse kontrollprooviga saadud muteerumissagedusest või aja jooksul kogutud andmetest saadud taustväärtusest suuremad muteerumissagedused) andmepunktide seerias, mis on suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 20–100 %, ning vähemalt üks andmepunkt on suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 20–25 %; 2) tõendid mutageensuse kohta puuduvad (st puudub doosi-vastuse seos, puuduvad paralleelse negatiivse kontrollprooviga saadud muteerumissagedusest või aja jooksul kogutud andmetest saadud taustväärtusest suuremad muteerumissagedused) andmepunktide seerias, mis on suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 25–100 %, ning olemas on ka negatiivne andmepunkt, mis jääb veidi alla 10 % suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse. Mõlemal juhul võib uuritava kemikaali lugeda negatiivseks.

70. Selgelt positiivset või negatiivset vastust ei ole vaja üle kontrollida.

71. Juhul, kui vastus ei ole eespool kirjeldatu kohaselt selgelt negatiivne ega selgelt positiivne ja/või kui eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdihinnangut ja/või täiendavaid uuringuid. Sellises olukorras võib olla kasulik teha korduskatse ja muuta vajaduse korral katsetingimusi (nt kontsentratsiooniintervalli, et suurendada andmepunktide saamise tõenäosust suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 10–20 %, või metabolismi aktiveerimise tingimusi (st S9 kontsentratsiooni või S9 päritolu) ja töötlemise kestust).

72. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavaid uuringuid teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne. Seepärast tuleks sel juhul lugeda uuritava kemikaaliga saadud vastus ebaselgeks (seda tõlgendatakse positiivse ja negatiivse tulemuse võrdvõimalikkusena).

KATSEPROTOKOLL

73. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;

— uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;

▼**M8**

— vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist.

Ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

Lahusti:

— lahusti valimise põhjendus;

— lahusti protsentuaalne sisaldus lõppsöötmes.

Rakud:

labori tüvikultuuride puhul:

— rakkude tüüp ja päritolu ning nendega katselaboris tehtud toimingud;

— karüotüübi andmed ja/või kromosoomide modaalarv;

— rakukultuuride säilitamise meetodid;

— teave mükoplasma puudumise kohta;

— rakkude arvu kahekordistumise aeg.

Katsetingimused:

— kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valiku põhjendus, sealhulgas näiteks andmed tsütotoksilisuse ja lahustuvuspiirangute kohta;

— söötme koostis, CO_2 kontsentratsioon, niiskusesisaldus;

— uuritava kemikaali kontsentratsioon, väljendatuna lõppkontsentratsioonina söötmes (nt µg/ml või mg/ml või mM);

— söötmele lisatud lahusti ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (ja/või ruumala);

— inkubeerimistemperatuur;

— inkubeerimisaeg;

— töötluse kestus;

— rakutihedus töötluse ajal;

▼**M8**

— metabolismi aktiveerimise süsteemi liik ja koostis (fraktsiooni S9 allikas, S9 segu valmistamise meetod, S9 segu ja S9 kontsentratsioon või ruumala lõppsöötmes, S9 kvaliteedikontrolli andmed);

— positiivsed ja negatiivsed kontrollained ja nende lõppkontsentratsioonid iga töötlemistingimuse puhul;

— ekspressiooniperioodi pikkus (samuti väljakülvatud rakkude arv ning vajaduse korral teave ümberkülvide ja söötmevahetusrežiimi kohta);

— selektiivaine identimisandmed ja kontsentratsioon;

— MLA korral tuleb näidata kasutatud variant (agar või mikrotiiterplaat);

— katse nõuetekohasuse kriteeriumid;

— eluvõimeliste ja muteerunud rakkude loendamiseks kasutatud meetodid;

— tsütotoksilisuse mõõtmiseks kasutatud meetodid;

— muu täiendav asjakohane teave tsütotoksilisuse ja kasutatud meetodi kohta;

— väljakülvamisele järgneva inkubeerimise kestus;

— kolooniate määratlus, milles on arvesse võetud kolooniate arvu ja tüüpi (sh „väikeste“ ja „suurte“ kolooniate kriteeriumid, vajaduse korral);

— uuringutulemuse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks liigitamise kriteeriumid;

— pH, osmolaalsuse (kui määratakse) ja sademe määramiseks kasutatud meetodid, kui on asjakohane.

Tulemused:

— töödeldud rakkude arv ja ümberkülvatud rakkude arv igas kultuuris;

— toksilisuse näitajad (MLA korral suhteline kogukasv ja TK6 korral suhteline ellujäämus);

— sadenemise ilmingud ja nende täheldamise aeg;

— selektiivainega ja selektiivaineta söötmesse külvatud rakkude arv;

— kolooniate arv selektiivaineta söötmes ja resistentsete kolooniate arv selektiivainega söötmes ning vastav muteerumissagedus;

— kolooniate suurus negatiivsetes ja positiivsete kontrollproovides ning kui uuritav kemikaal on positiivne, siis vähemalt ühe kontsentratsiooni juures, samuti vastavad muteerumissagedused;

— võimaluse korral andmed vastuse sõltuvuse kohta kontsentratsioonist;

— andmed paralleelsete negatiivsete (lahusti) kontrollproovide ja positiivsete kontrollproovide kohta (kontsentratsioonid ja lahustid);

— varasemate negatiivsete (lahusti) ja positiivsete kontrollproovide andmed (kontsentratsioonid ja lahustid), sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed; kontrollkatsete arv, mille alusel varasemad andmed on saadud;

▼M8

— statistilise analüüsi tulemused (iga kultuuri kohta eraldi ja vajaduse korral paralleelkultuuride koondandmed) ja vajaduse korral p-väärtused ning MLA korral GEF-hinnang.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J. (koostaja), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. ja Stankowski, L.F. Jr. (2000), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report“, *Environ. Mol. Mutagen.,* nr 35 (3), lk 185–190.

(2) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. ja Stankowski, L.F. Jr. (2002), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (Aprill 2000)“, *Environ. Mol. Mutagen.,* nr 40 (4), lk 292–299.

(3) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. ja Yoshimura, I. (2003), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report“, *Mutation Res.,* nr 540, lk 127–140.

(4) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. ja Yoshimura, I. (2006), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation“, *Environ. Mol. Mutagen.,* nr 47 (1), lk 1–5.

(5) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. ja Van Goethem, F. (2007), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment“, *Mutation. Res.*, nr 627 (1), lk 36–40.

(6) OECD (2016), Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 238. OECD, Pariis.

(7) Fellows M. D., Luker, T., Cooper, A. ja O'Donovan, M.R. (2012), „Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors“, *Mutation, Res.*, nr 746 (1), lk 21–28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. ja Hayashi, M. (2001), „Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction“, *Mutation Res.*, nr 493 (1–2), lk 101–114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. ja Moore, M. M. (2009), „The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy“, *Toxicol. Sci.,* nr 109 (1), lk 96–105.

(10) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. ja Hozier, J. C. (1990), „Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells“, *Proc. National. Academy. Sci. USA*, nr 87 (1), lk 51–55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. ja Clive, D. (1981), „Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System“, *Mutation Res.*, nr 84 (1), lk 169–181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. ja Moore, M. M. (1985), „Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History“, *Mutation Res.*, nr 147 (5), lk 237–242.

(13) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. ja Sawyer, J. (1985), „Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells“, *Mutation Res.,* nr 151 (1), lk 161–174.

(14) Liber, H. L., Call, K. M. ja Little, J. B. (1987), „Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells“, *Mutation Res.*, nr 178 (1), lk 143–153.

(15) Li, C. Y., Yandell, D. W. ja Little, J. B. (1992), „Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*“, *Somat. Cell Mol. Genet.*, nr 18 (1), lk 77–87.

(16) Honma, M., Hayashi, M. ja Sofuni, T. (1997), „Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells“, *Mutation. Res.*, nr 374 (1), lk 89–98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. ja Hayashi, M. (2000), „Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity“, *Mol. Carcinogen.*, nr 28 (4), lk 203–14.

(18) Amundson, S. A. ja Liber, H. L. (1992), „A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants“, *Mutation Res.*, nr 267 (1), lk 89–95.

(19) Schisler, M. R., Moore, M. M. ja Gollapudi, B. B. (2013), „*In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay“, *Protocols in Genotoxicity Assessment*, toim. A. Dhawan ja M. Bajpayee, Springer Protocols, Humana Press, lk 27–50.

(20) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J. ja Halliwell, B. (2007), „Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium“, *Mutation Res.,* nr 634 (1–2), lk 177–183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. ja Marzin, D. (2008), „Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 49 (6), lk 439–452.

(22) Brusick, D. (1986), „Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations“, *Environ. Mutagen.,* nr 8 (6), lk 879–886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. ja Okumura, K. (1992), „Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells“, *Mutation Res.*, nr 268 (2), lk 297–305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr, Brusick, D., Ashby, J. ja Myhr, B. C. (1991), „Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9“, *Mutation Res.*, nr 257, lk 147–204.

(25) Wang, J., Heflich, R. H. ja Moore, M. M. (2007), „A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay“, *Mutation Res.,* nr 626 (1–2), lk 185–190.

(26) Fischer, G. A. (1958), „Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*“, *Ann. N.Y. Academy Sci.*, nr 76, lk 673–680.

(27) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. ja Brown, M. M. M. (1979), „Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System“, *Mutation Res.*, nr 59(1), lk 61–108.

(28) Sawyer, J., Moore, M. M., Clive, D. ja Hozier, J. (1985), „Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line“, *Mutation Res.*, nr 147 (5), lk 243–253.

(29) Sawyer J. R., Moore M. M. ja Hozier J. C. (1989), „High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line“, *Mutation Res.*, nr 214 (2), lk 181–193.

(30) Sawyer, J. R., Binz, R. L., Wang, J. ja Moore, M. M. (2006), „Multi-color Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 47 (2), lk 127–131.

(31) Fellows, M. D., McDermott, A., Clare, K. R., Doherty, A. ja Aardema, M. J. (2014), „The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 55 (1), lk 35–42.

(32) Storer, R. D., Jraynak, A. R., McKelvey, T. W., Elia, M. C., Goodrow, T.L. ja DeLuca, J.G. (1997), „The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene“, *Mutation. Res.*, nr 373 (2), lk 157–165.

(33) Clark L. S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S. H. ja Moore, M. M. (2004), „Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells“, *Mutagen.,* nr 19 (4), lk 263–268.

(34) Skopek, T. R., Liber, H. L., Penman, B. W. ja Thilly, W. G. (1978), „Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, nr 84 (2), lk 411–416.

(35) Honma, M. (2005), „Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 45 (2–3): lk 162–176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y. H., Tsang, N. M., Yandell, D. W., Kelsey, K. T. ja Liber, H. L. (1995), „Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines“, *Cancer. Res.*, nr 55 (1), lk 12–15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., Moore, M., Clements, J., O'Donovan, M., Honma, M., Kohara, A., van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M. J., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Kim, J., Sutter, A., Kirkland, D. J. (2015), „Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing.“ (Pooleliolev käsikiri.)

(38) Lloyd, M. ja Kidd, D. (2012), „The Mouse Lymphoma Assay“, *Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods*, toim. Parry ja Parry, Humana Press, ISBN 978-1-61779-420-9, lk 35–54.

(39) Mei, N., Guo, X. ja Moore M. M. (2014), „Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity“ väljaandes *Optimization in Drug Discover: In Vitro Methods*, toim. Yan, Z. ja Caldwell, 2. trükk, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber, H. L. ja Thilly, W. G. (1982), „Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts“, *Mutation Res.*, nr 94 (2), lk 467–485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. ja Stokes, W. (2005), „Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice“, *ATLA*, nr 33 (3), lk 261–287.

(42) Moore, M. M. ja Howard, B. E. (1982), „Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium“, *Mutation Res.,* nr 104 (4–5), lk 287–294.

(43) Ames, B. N., McCann, J. ja Yamasaki, E. (1975), „Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test“, *Mutation Res.*, nr 31 (6), lk 347–364.

(44) Maron, D. M. ja Ames, B. N. (1983), „Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test“, *Mutation Res.*, nr 113 (3–4), lk 173–215.

(45) Natarajan, A. T., Tates, A. D, Van Buul, P. P. W., Meijers, M. ja de Vogel, N. (1976), „Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes“, *Mutation Res.*, nr 37 (1), lk 83–90.

(46) Matsuoka, A., Hayashi, M. ja Ishidate, M. Jr. (1979), „Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*“, *Mutation Res.*, nr 66 (3), lk 277–290.

(47) Ong, T. M. *et al.* (1980), „Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver“, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, nr 4 (1), lk 55–65.

(48) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. ja Wolf, R. C. (1992), „Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays“, *Mutagen.*, nr 7 (3), lk 175–177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. ja Sugimura, T. (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“ väljaandes *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, toim. de Serres F. J. *et al.* , Elsevier, North-Holland, lk 85–88.

▼**M8**

(50) Galloway, S. M. *et al.* (1994), „Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations“, *Mutation Res.*, nr 312 (3), lk 241–261.

(51) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. ja Galloway, S. M. (1996), „Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9“, *Environ. Mol. Mutagen.,* nr 28 (1), lk 51–59.

(52) UNEP (2001), Püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon. Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni Keskkonnaprogramm (UNEP).

(53) Krahn, D. F., Barsky, F. C. ja McCooey, K. T. (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“ väljaandes *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, toim. Tice, R. R., Costa, D. L. ja Schaich, K. M., New York, Plenum, lk 91–103.

(54) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. ja Brooks, A. L. (1983), „Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay“, *Environ. Mutagen.*, nr 5 (6), lk 795–801.

(55) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S. ja Matsushima, T. (2008), „An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay“, *Mutation Res.*, nr 652 (2), lk 122–130.

(56) Arlett, C. F. *et al.* (1989), „Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation“ väljaandes *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, toim. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, lk 66–101.

(57) Morita, T., Honma, M. ja Morikawa, K. (2012), „Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity“, *Mutation Res.*, nr 741 (1–2), lk 32–56.

(58) Brookmire, L., Chen, J. J. ja Levy, D. D. (2013), „Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 54 (1), lk 36–43.

(59) USA Toidu- ja Ravimiamet (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Kättesaadav aadressil [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma, M. ja Hayashi, M. (2011), „Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 52 (5), lk 373–384.

(61) Moore-Brown, M. M., Clive, D., Howard, B. E., Batson, A. G. ja Johnson, K. O. (1981), „The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells“, *Mutation Res.*, nr 85 (5), lk 363–378.

(62) Liber, H. L., Yandell, D. W. ja Little, J. B. (1989), „A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus“, *Mutation Res.*, nr 216 (1), lk 9–17.

(63) Furth, E. E., Thilly, W. G., Penman, B. W., Liber, H. L. ja Rand, W. M. (1981), „Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates“, *Anal. Biochem.*, nr 110 (1), lk 1–8.

(64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. ja Thybaud, V. (2011), „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data“, *Mutation Res.*, nr 723 (2), lk 87–90.

▼**M8**

(65) Ryan, T. P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement. 2. trükk. John Wiley & Sons, New York.

(66) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 199), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(67) Fleiss, J. L., Levin, B. ja Paik, M. C. (2003), Statistical Methods for Rates and Proportions. 3. trükk. John Wiley & Sons, New York.

▼M8

1. liide

MÕISTED

Aneugeen: iga kemikaal või protsess, mis põhjustab interaktsiooni kaudu mitootilise või meiootilise rakujagunemise tsükli komponentidega rakkude või organismide aneuploidsust.

Aneuploidsus: iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidsus).

Aluspaarivahetust põhjustav mutageen: kemikaal, mis kutsub esile aluspaari vahetuse DNAs.

Kemikaal: aine või segu.

Kloonimistõhusus: väikesel tihedusel välja külvatud rakkude hulgas esinevate selliste rakkude protsentuaalne osakaal, mis on võimelised moodustama loendatava koloonia.

Klastogeen: iga kemikaal, mis põhjustab rakkude või organismide populatsioonis struktuurseid kromosoomiaberratsioone.

Tsütotoksilisus: käesoleva katsemeetodi kohaste katsete puhul on tsütotoksilisus määratletud kui suhtelise kogukasvu (MLA korral) või suhtelise ellujäämuse (TK6 korral) vähenemine.

Otsemutatsioon: geenimutatsioon, mille puhul algne geen võtab mutantse vormi ja mille tulemusena muutub või kaob asjaomase kodeeritud valgu ensümaatiline aktiivsus või funktsioon.

Raaminihet põhjustav mutageen: kemikaal, mille mõjul lisatakse DNA molekuli või eemaldatakse sealt üks või mitu aluspaari.

Genotoksilisus: üldmõiste, mis hõlmab DNA ja kromosoomide igat liiki kahjustusi, sealhulgas DNA-ahela katkemisi, adukte, ümberkorraldusi, mutatsioone, kromosoomiaberratsioone ja aneuploidsust põhjustavaid omadusi. Genotoksiline mõju ei väljendu alati mutatsiooni või püsiva kromosoomikahjustusena.

Mitootiline rekombinatsioon: mitoosi ajal homoloogsete kromatiidide vahel toimuv rekombinatsioon, millega võib kaasneda DNA kahe ahela katkemine või heterosügootsuse kadu.

Mutageensus: omadus, mis põhjustab pärilikke muutusi geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomiaberratsioonid).

Muteerumissagedus (MF): vaadeldud mutantrakkude arv, mis on jagatud elujõuliste rakkude arvuga.

Fenotüübi ekspressiooniaeg: töötlusele järgnev aeg, mille vältel geneetiline muutus kinnistub genoomis ja mis tahes varem esinenud geeniproduktide sisaldus väheneb nii palju, et asjaomane fenotüübiline tunnus muutub.

Suhteline ellujäämus (RS): näitaja, mille kaudu TK6 korral väljendatakse töötlusest tulenevat tsütotoksilisust. See on vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusus (CE), mida on kohandatud rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise ajal, võrrelduna negatiivse kontrollprooviga leitud kloonimistõhususega.

▼M8

Suhteline suspensioonikasv (RSG): MLA korral katsekultuuri kogu suhteline suspensioonikasv kahe päeva jooksul, võrrelduna negatiivse/lahusti kontrollprooviga leitud kogu suspensioonikasvuga kahe päeva jooksul (Clive ja Spector, 1975). RSG peaks hõlmama katsekultuuri suhtelist kasvu võrrelduna negatiivse/-lahusti kontrollprooviga töötlemisperioodi jooksul.

Suhteline kogukasv (RTG): näitaja, mille kaudu MLA korral väljendatakse töötlusest tulenevat tsütotoksilisust. Sellega väljendatakse katsekultuuride suhtelist (kandeaine kontrollprooviga võrreldud) kasvu katse töötlemis-, kahepäevases avaldumis- ja mutantide selektiivse kloonimise faasis. Iga katsekultuuri RSG korrutatakse katsekultuuri suhtelise kloonimistõhususega mutantide selekteerimise ajal ning väljendatakse negatiivse/kandeaine kontrollprooviga leitud kloonimistõhususe suhtes (Clive ja Spector, 1975).

Maksafraktsioon S9: maksa homogenaadi supernatant, mis on eraldatud pärast tsentrifuugimist 9 000g juures, st maksa toorekstrakt.

S9 segu: maksafraktsiooni S9 ja metaboolsete ensüümide aktiivsuse tagamiseks vajalike kofaktorite segu.

Suspensioonikasv (SG): rakkude arvu kordne suurenemine MLA töötlemis- ja avaldumisfaasi jooksul. SG arvutamiseks korrutatakse lühiajalise töötlemise (3 või 4 tundi) korral kordne kasv 1. päeval kordse kasvuga 2. päeval. Kui kasutati 24-tunnist töötlemist, on SG 24 tunnise töötlemisaja kordse kasvu korrutis 1. ja 2. avaldumispäeva kordsete kasvudega.

Lahusti kontrollproov: üldmõiste, millega tähistatakse kontrollkultuuri, kuhu on lisatud üksnes uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahustit.

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Töötlemata kontrollproov: töötlemata kontrollproovid on rakukultuurid, mida ei ole töödeldud (st ei uuritava kemikaali ega lahustiga), kuid mida on käideldud samaaegselt samal viisil kui uuritava kemikaaliga töödeldud rakukultuure.

▼M8

2. liide

VALEMID

Tsütotoksilisus

Nii MLA agari- kui ka mikrotiiterplaadi variandi korral

Tsütotoksilisus on määratletud suhtelise kogukasvuna (RTG), mis hõlmab suhtelise kogukasvu (RSG) 2-päevase avaldumisperioodi jooksul ja mutantide selekteerimise ajal leitud suhtelise kloonimistõhususe (RCE). Nii RTG, RSG kui ka RCE väljendatakse protsentides.

RSG arvutamine: suspensioonikasv SG_1 on 0-päeva ja 1. päeva vaheline kasvumäär (rakkude kontsentratsiooni 1. päeval / rakkude kontsentratsioon 0-päeval) ja suspensioonikasv SG_2 on 1. päeva ja 2. päeva vaheline kasvumäär (rakkude kontsentratsioon 2. päeval / rakkude kontsentratsioon 1. päeval). RSG on töödeldud kultuuri kogu SG ($SG_1 \times SG_2$) võrrelduna töötlemata/lahusti kontrollproovi omaga. Seega: RSG = $[SG_{1(uuritav)} \times SG_{2(uuritav)}]$ / $[SG_{1(kontrollproov)} \times SG_{2(kontrollproov)}]$. SG_1 arvutamisel tuleb lähtuda rakkude algsest kontsentratsioonist, mida kasutati rakkude töötlemise alguses. Seega võetakse arvesse rakkude töötlemise ajal katsekultuuris ilmnevaid erinevaid tsütotoksilisi toimeid.

RCE on katsekultuuri suhteline kloonimistõhusus võrreldes töötlemata/lahusti kontrollproovi suhtelise kloonimistõhususega mutantide selekteerimise ajal.

Suhteline kogukasv (RTG): RTG=RSG × RCE

TK6

Suhteline Ellujäämus (RS):

tsütotoksilisust hinnatakse suhtelise ellujäämusega, st vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhususega, kohandatuna rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise käigus ja võrrelduna kloonimistõhususega negatiivsete kontrollproovide puhul, mille ellujäämuseks loetakse 100 %. Kohandusarvutus, mis võtab arvesse rakkude arvu vähenemist töötlemise ajal, on järgmine:

$$\text{Kohandatud CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{Rakkude arv töötlemise lõpus}}{\textit{Rakkude arv töötlemise alguses}}$$

Uuritava kemikaaliga töödeldud kultuuri RS arvutatakse järgmiselt:

$$RS = \frac{\textit{Kohandatud CE töödeldud kultuuris}}{\textit{Kohandatud CE lahusti kontrollproovis}} \times 100$$

Muteerumissagedus MLA ja TK6 Korral

Muteerumissagedus (MF) on mutantsete kolooniate kloonimistõhusus selektiivsöötmes (CE_M), mis on kohandatud selekteerimisaegse kloonimistõhususega selektiivaineta söötmes (CE_V). Seega MF = CE_M/CE_V. Nende kahe kloonimistõhususe arvutuskäigud on esitatud allpool kloonimise agari- ja mikrotiiterplaadimeetodi jaoks.

▼**M8**

***MLA agarivariant**:* MLA pehme agari variandi korral saadakse kolooniate arv mutantide selekteerimisplaadil (C_M) ja kolooniate arv selektiivaineta või kloonimistõhususe (eluvõimeliste rakkude arv) leidmise plaadil (C_V) vahetult kolooniaid loendades. Kui 600 rakku külvatakse kloonimistõhususe (CE) määramiseks mutantide selekteerimisplaatidele (CE_M) ja selektiivaineta või kloonimistõhususe (eluvõimeliste rakkude arv) määramise plaatidele (CE_V) ja mutantide selekteerimiseks kasutatakse 3×10^6 rakku, siis

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

MLA ja TK6 mikrotiiterplaadi variant: MLA ja TK6 mikrotiiterplaadi variandi korral arvutatakse C_M ja C_V korrutisena mikrotiiterplaadi süvendite koguarvust (TW) ja tõenäolisest kolooniate arvust süvendi kohta (P).

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

Lähtudes Poissoni jaotuse kujust, kui argument on null (Furth *et al*., 1981), saab P avaldada järgmiselt:

$P = - \ln (EW / TW)$,

kus E_W on tühjade süvendite arv ja T_W on süvendite koguarv. Niisiis:

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

MLA mikrotiiterplaadi variandi korral arvutatakse väikeste ja suurte kolooniate muteerumissagedused samal viisil, kasutades vastavalt väikeste ja suurte kolooniatega seotud tühjade süvendite arvu.

TK6 korral on väikeste ja suurte kolooniate muteerumissageduste aluseks vara tekkivad ja hilja tekkivad mutandid.

▼M8

B.68. **LÜHIAJALISE KOKKUPUUTE IN VITRO KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEOSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 491 (2017). Lühiajalise kokkupuute katsemeetod on *in vitro* meetod, mida võib teatavatel asjaoludel ja teatavate piirangutega kasutada, et klassifitseerida ja märgistada kemikaale (aineid ja segusid), mis põhjustavad rasket silmakahjustust või silmade ärritust, nagu need on määratletud Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1) ning Euroopa Liidu määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus) ([1]).

2. Paljude aastate jooksul on kemikaalidest tingitud silmakahjustuse ohu hindamiseks kasutatud peamiselt *in vivo* silmakatset küülikul (katsemeetod B.5 (8), samaväärne OECD katsejuhendiga nr 405). Üldiselt ollakse arvamusel, et lähitulevikus ei ole võimalik rasket silmakahjustust tekitava / silmi ärritava toime kogu ulatuse prognoosimisel eri kemikaaliklasside puhul ühegi alternatiivse *in vitro* katsega täielikult asendada *in vivo* silmakatset küülikul. Kuid astmelise katsetamise strateegia osana kasutatava mitme alternatiivse katsemeetodi strateegilise kombineerimisega võib siiski olla võimalik küüliku silmakatset (2) täielikult asendada. Ülalt-alla lähenemisviisi tuleks kasutada katsetes kemikaalidega, mille puhul olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et asjaomane kemikaal võib silma tugevasti ärritada või põhjustada raske silmakahjustuse. Alt-üles lähenemisviisi tuleks kasutada vastupidiselt katsetes kemikaalidega, millel puhul olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et asjaomane kemikaal ei põhjusta klassifitseerimiseks piisavat silmade ärritust. Kuigi ei peeta võimalikuks, et lühiajalise kokkupuute katsemeetod asendaks täielikult *in vivo* silmakatset küülikuga, sobib see kasutamiseks astmelise katsetamise strateegia osana õigusliku klassifitseerimise ja märgistamise jaoks näiteks ülalt-alla ja alt-üles lähenemisviisi puhul, et teha täiendava katsetamiseta kindlaks i) kemikaalid, mis põhjustavad raske silmakahjustuse (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria) ja ii) kemikaalid (välja arvatud väga lenduvad ained ja kõik tahked kemikaalid peale pindaktiivsete ainete), mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane kategooria puudub) (1, 2). Kuid niisugune kemikaal, mille puhul lühiajalise kokkupuute katsemeetodiga ei prognoosita raske silmakahjustuse põhjustamist (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria) ega ka ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooria puudumist (ei põhjusta rasket silmakahjustust ega silmade ärritust), vajab siiski täiendavat uurimist, et saaks määrata lõpliku klassifikatsiooni. Peale selle tuleks konsulteerida asjakohaste reguleerivate asutustega, enne kui lühiajalise kokkupuute katset hakatakse muu kui ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimisskeemi korral kasutama alt-üles lähenemisviisi rakendamiseks. Kõige asjakohasema katsemeetodi valimist ja selle kasutamist tuleks vaadelda raske silmakahjustuse ja silmade ärrituse põhjustamise uurimiseks ja hindamiseks kasutatavaid kompleksseid lähenemisviise käsitleva OECD juhenddokumendi (14) kontekstis.

3. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada eeskirju, mida kasutatakse, et hinnata uuritava kemikaali võimalikku ohtlikkust silmale selle võime põhjal kutsuda esile tsütotoksilisust lühiajalise kokkupuute meetodi kasutamisel.

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353/1, 31.12.2008).

▼**M8**

Kemikaalide tsütotoksiline mõju sarvkesta epiteelirakkudele on oluline toimemehhanism, mille tulemusena tekib sarvkesta epiteeli kahjustus ja silmade ärritus. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodiga mõõdetakse rakkude eluvõimelisust vitaalvärvaine MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine) ensümaatilise muundamise järgi siniseks formasaansoolaks, mis pärast rakkudest ekstraheerimist määratakse kvantitatiivselt (3). Saadud rakkude eluvõimelisust võrreldakse lahusti kontrollprooviga (suhteline eluvõimelisus) ja kasutatakse uuritavast kemikaalist tingitud võimaliku silmakahjustuse ohu hindamiseks. Uuritav kemikaal klassifitseeritakse ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. kategooriasse, kui nii 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures on rakkude eluvõimelisus alla 70 % või sellega võrdne. Kui rakkude eluvõimelisus nii 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures on üle 70 %, viidatakse kemikaalile kui ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata kemikaalile.

4. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse terminit „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava terminina ja see ei ole seotud lühiajalise kokkupuute katsemeetodi kohaldatavusega ainete ja/või segude uurimiseks. Mõisted on esitatud liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

5. Käesolev katsemeetod põhineb Kao Corporationi välja töötatud metoodikal (4), millega viidi läbi kaks eraldi valideerimisuuringut: ühe tegi Jaapani loomkatsete alternatiivide ühing (JSAAE) (5) ning teise Jaapanialternatiivmeetodite valideerimiskeskus (JaCVAM) (6). Vastastikuse eksperdihinnangu tegid Ameerika Ühendriikide riikliku toksikoloogiaprogrammi (NTP) alternatiivsete toksikoloogiameetodite ametitevaheline keskus (National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) ja alternatiivmeetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (7) valideerimisuuringute aruannete ning katsemeetodi taustaülevaatedokumentide põhjal.

6. Kui lühiajalise kokkupuute katsemeetodit kasutatakse selliste kemikaalide (ainete ja segude) kindlakstegemiseks, mis tekitavad rasket silmakahjustust (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria) (1), on lühiajalise kokkupuute katsemeetodil 125 kemikaali (nii ained kui ka segud) kohta saadud andmete kogutäpsus 83 % (104/125), valepositiivsete tulemuste määr on 1 % (1/86) ja valenegatiivsete tulemuste määr 51 % (20/39), võrreldes küüliku *in vivo* silmakatsega (7). Saadud valenegatiivsete tulemuste määr ei ole selles kontekstis kriitiline, sest kõiki uuritavaid kemikaale, mille puhul rakkude eluvõimelisus 5 % kontsentratsiooni juures on ≤ 70 % ja 0,05 % kontsentratsiooni juures > 70 %, uuritakse järgmiseks muude asjakohaselt valideeritud *in vitro* katsemeetoditega või viimase võimalusena, olenevalt regulatiivsetest nõuetest, küüliku *in vivo* silmakatsetes kooskõlas järjestikuse katsete tegemise strateegia ning hetkel soovitatava tõendite kaalukuse lähenemisviisiga (1, 8). Põhiliselt uuriti ühe koostisosaga aineid, kuigi piiratud kogus andmeid on olemas ka katsetest segudega. See katsemeetod on siiski tehniliselt kohaldatav mitme koostisosaga ainete ja segude uurimiseks. Enne kui kasutada seda katsemeetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb siiski kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi, ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodil ei ole spetsiifilisi puudusi, kui seda kasutatakse nende uuritavate kemikaalide kindlakstegemisel, mis kuuluvad ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. kategooriasse. Teadlased võiksid kaaluda uuritavate kemikaalide puhul kõnealuse katsemeetodi kasutamist, kusjuures rakkude eluvõimelisus ≤ 70 % nii 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures tuleks lugeda tõendiks, et kemikaal põhjustab rasket silmakahjustust ja tuleks liigitada ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. kategooriasse ilma edasise katsete tegemiseta.

▼**M8**

7. Kui lühiajalise kokkupuute katsemeetodit kasutatakse selliste kemikaalide (ainete ja segude) kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse ja raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane kategooria puudub), on lühiajalise kokkupuute katsemeetodil 130 kemikaali (nii ained kui ka segud) kohta saadud andmete kogutäpsus 85 % (110/130), valenegatiivsete tulemuste määr on 12 % (9/73) ja valepositiivsete tulemuste määr 19 % (11/57), võrreldes küüliku *in vivo* silmakatsega (7). Kui andmestikust jäetakse välja väga lenduvad ained ja tahked ained peale pindaktiivsete ainete, paraneb kogutäpsus 90 %-ni (92/102), valenegatiivsete tulemuste määra 2 %-ni (1/54) ja valepositiivsete tulemuste määr 19 %-ni (9/48) (7). Seega on lühiajalise kokkupuute katsemeetodi võimalik puudus nende kemikaalide kindlakstegemiseks kasutamise korral, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane kategooria puudub), suur valepositiivsete tulemuste määr, kui tegemist on i) üle 6 kPa aururõhuga väga lenduvate ainetega ning ii) tahkete kemikaalidega (ained ja segud), välja arvatud pindaktiivsed ained ja ainult pindaktiivsetest ainetest koosnevad segud. Niisugused kemikaalid jäetakse lühiajalise kokkupuute katsemeetodi (7) kohaldamisvaldkonnast välja.

8. Lisaks punktides 6 ja 7 nimetatud kemikaalidele sisaldab lühiajalise kokkupuute katsemeetodiga saadud andmestik ettevõttesiseseid andmeid 40 segu kohta ning võrreldes Draize'i *in vivo* silmakatsega on nende andmete täpsus 88 % (35/40), valepositiivsete tulemuste määr 50 % (5/10) ja valenegatiivsete tulemuste määr 0 % (0/30), kui prognoosida nende segude omadusi, mida ei ole vaja ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimissüsteemide kohaselt klassifitseerida (9). Seega võib lühiajalise kokkupuute katsemeetodit kasutada ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata segude kindlakstegemiseks alt-üles lähenemisviisi järgides, välja arvatud muude tahkete segude korral kui ainult pindaktiivsetest ainetest koosnevad segud, kuna nendele laieneb tahkete ainetega seotud piirang. Peale selle tuleks segusid, mis sisaldavad üle 6 kPa aururõhuga aineid, hoolikalt hinnata, et vältida võimalikku alahindamist, ning see peab olema igal üksikjuhtumil põhjendatud.

9. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodit ei saa kasutada nende uuritavate kemikaalide kindlakstegemiseks, mida klassifitseerida ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 2. kategooriasse, ÜRO GHSi kohasesse 2A (silmade ärritus) või 2B kategooriasse (kerge silmade ärritus); selle põhjuseks on nende ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase 1. kategooria kemikaalide suur arv, mis on alahinnatud 2., 2A või 2B kategooriasse kuuluvaks, samuti nende ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata kemikaalide suur arv, mis on ülehinnatud 2., 2A või 2B kategooriasse kuuluvaks (7). Selleks võib vaja minna täiendavaid uuringuid muu sobiva meetodiga.

10. Lühiajalise kokkupuute meetod sobib uuritavate kemikaalide puhul, mis lahustuvad füsioloogilises lahuses, 5 % dimetüülsulfoksiidisisaldusega füsioloogilises lahuses või mineraalõlis või suspendeeruvad nendes ühtlaselt vähemalt viieks minutiks. Lühiajalise kokkupuute meetod ei sobi uuritavate kemikaalide puhul, mis füsioloogilises lahuses, 5 % dimetüülsulfoksiidisisaldusega füsioloogilises lahuses või mineraalõlis ei lahustu ega nendes vähemalt viieks minutiks ühtlaselt ei suspendeeru. Mineraalõli kasutamine lühiajalise kokkupuute meetodi korral on võimalik lühiajalise kokkupuute tõttu. Seega sobib lühiajalise kokkupuute meetod vees lahustumatute uuritavate kemikaalide (nt pikaahelalised rasvhapped või ketoonid) võimaliku silmale ohtlikkuse hindamiseks tingimusel, et kõnealused kemikaalid segunevad vähemalt ühega kolmest eespool soovitatud lahustist (4).

▼M8

11. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse terminit „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava terminina ([1]) ja see ei ole seotud lühiajalise kokkupuute katsemeetodi kohaldatavusega ainete ja/või segude uurimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

12. Lühiajalise kokkupuute katsemeetod on tsütotoksilisusel põhinev *in vitro* meetod, mis viiakse läbi Taani riikliku seerumiinstituudi küüliku sarvkesta (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea – SIRC) rakkude konfluentse monokihiga, mis kasvatatakse 96 süvendiga, polükarbonaadist mikrotiiterplaadil (4). Pärast 5-minutist kokkupuudet uuritava kemikaaliga määratakse tsütotoksilisus kvantitatiivselt SIRC-rakkude suhtelise eluvõimelisusena MTT-katsel (4). Rakkude vähenenud eluvõimelisuse alusel prognoositakse silmakahjustusi põhjustavat võimalikku kahjulikku mõju.

13. On teatatud, et 80 % küüliku silma tilgutatud lahusest väljutatakse sidekestakoti kaudu kolme kuni nelja minuti jooksul ning üle 80 % inimese silma tilgutatud lahusest väljutatakse ühe kuni kahe minuti jooksul (10). Lühiajalise kokkupuute katsemeetodiga on püütud neid kokkupuuteaegu ühtlustada ning kasutatud tsütotoksilisust näitajana, mille alusel hinnata pärast 5-minutist kokkupuudet uuritava kemikaaliga SIRC-rakkudele tekitatud kahjustuste ulatust.

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

14. Enne käesoleval katsemeetodil põhineva lühiajalise kokkupuute meetodi rutiinset kasutamist tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, klassifitseerides õigesti tabelis 1 soovitatud üksteist ainet. Need ained on valitud nii, et need esindavad rasket silmakahjustust või silmade ärritust tekitavate ainete põhjustatud reaktsioonide täielikku vahemikku, mis põhineb küüliku silma *in vivo* katse (katsemeetod 405) ja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemi tulemustel (1). Teisteks valikukriteeriumideks olid ainete kaubanduslik kättesaadavus, kvaliteetsete võrdlusandmete kättesaadavus *in vivo* katsete kohta ning kvaliteetsete võrdlusandmete kättesaadavus lühiajalise kokkupuute meetodil tehtud *in vitro* katsete kohta (3). Olukorras, kus loetletud aine ei ole kättesaadav, või kui see on põhjendatud, võib kasutada muud ainet, mille puhul on kättesaadavad piisavad võrdlusandmed *in vivo* ja *in vitro* katsete kohta, eeldusel, et järgitakse eespool kirjeldatud kriteeriumeid.

Tabel 1

Pädevuse tõendamise ainete loend

Aine	CASi nr	Aineklass ([1])	Füüsikaline olek	*In vivo* katsel määratud ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria ([2])	Lühiajalise kokkupuute katsel kasutatud lahusti	Lühiajalise kokkupuute katsel määratud ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria
Bensalkooniumkloriid (10 % vesilahus)	8001-54-5	Ooniumühend	Vedel	1. kategooria	Füsioloogiline lahus	1. kategooria
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eeter	Vedel	1. kategooria	Füsioloogiline lahus	1. kategooria

([1]) 2013. aasta juunis lepiti ühiskoosolekul kokku, et võimaluse korral kasutatakse uute ja ajakohastatud katsemeetodite kirjeldustes uurimisobjektile viitamiseks järjepidevamalt terminit „uuritav kemikaal“.

▼**M8**

Aine	CASi nr	Aineklass ([1])	Füüsikaline olek	*In vivo* katsel määratud ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria ([2])	Lühiajalise kokkupuute katsel kasutatud lahusti	Lühiajalise kokkupuute katsel määratud ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria
Happeline punane 92	18472-87-2	Heterotsükliline ühend; broomiühend; klooriühend	Tahke	1. kategooria	Füsioloogiline lahus	1. kategooria
Naatriumhüdroksiid	1310-73-2	Leelis; anorgaaniline aine	Tahke	1. kategooria ([3])	Füsioloogiline lahus	1. kategooria
Butürolaktoon	96-48-0	Laktoon; heterotsükliline ühend	Vedel	2A kategooria (CLP-määruse kohane 2. kategooria)	Füsioloogiline lahus	Prognoosida ei ole võimalik
1-oktanool	111-87-5	Alkohol	Vedel	2A/B kategooria ([4])(CLP-määruse kohane 2. kategooria)	Mineraalõli	Prognoosida ei ole võimalik
Tsüklopentanool	96-41-3	Alkohol; süsivesinik (tsükliline)	Vedel	2A/B kategooria ([5]) (CLP-määruse kohane 2. kategooria)	Füsioloogiline lahus	Prognoosida ei ole võimalik
2-etoksüetüülatsetaat	111-15-9	Alkohol; eeter	Vedel	Kategooriata	Füsioloogiline lahus	Kategooriata
Dodekaan	112-40-3	Süsivesinik (atsükliline)	Vedel	Kategooriata	Mineraalõli	Kategooriata
Metüülisobutüülketoon	108-10-1	Ketoon	Vedel	Kategooriata	Mineraalõli	Kategooriata

▼M8

Aine	CASi nr	Aineklass (1)	Füüsikaline olek	*In vivo* katsel määratud ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria (2)	Lühiajalise kokkupuute katsel kasutatud lahusti	Lühiajalise kokkupuute katsel määratud ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria
1,1-dimetüülguanidiinsulfaat	598-65-2	Amidiin Väävliühend	Tahke	Kategooriata	Füsioloogiline lahus	Kategooriata

(1) Aineklasside määramisel kasutati NICEATMi varem avaldatud materjalist saadud teavet ning kui see ei olnud kättesaadav, siis USA riikliku meditsiiniraamatukogu (National Library of Medicine) tesaurust MeSH® (Medical Subject Headings) (andmebaasi ChemIDplus® kaudu, kättesaadav veebisaidil http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) ning NICEATMi määratlusi.

(2) Põhineb küüliku *in vivo* silmakatse (OECD katsejuhend nr 405) tulemustel ning selles kasutatakse ÜRO GHSi / CLP-määruse kohast klassifikatsiooni (1).

(3) Klassifitseeritud 1. kategooriasse 100 % naatriumhüdroksiidi nahasöövitusvõime (loetletud OECD katsejuhendis 435 pädevuse tõendamise kemikaalina, millel on nahasöövitusvõime) ja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. kategooriasse klassifitseerimise kriteeriumi alusel (1).

(4) Klassifitseerimine 2A või 2B kategooriasse oleneb selle ÜRO GHSi kriteeriumi tõlgendusest, mille alusel neid kahte kategooriat eristatakse, st 7. päeval peab mõju avalduma veel vastavalt kahel või neljal loomal kuuest; viimasel juhul klassifitseeritakse kemikaal 2A kategooriasse. *In vivo* katsetel saadud andmestik hõlmab kaht uuringut, millest kummaski kasutati kolme looma. Ühes uuringus ilmnesid 7. päeval mõjud kahel loomal kolmest, mis klassifitseerimist õigustab 2A kategooriasse (11), kuid teises uuringus olid kõigil kolmel loomal 7. päevaks kõik näitajad saavutanud nulltaseme, mis õigustab klassifitseerimist 2B kategooriasse (12).

(5) Klassifitseerimine 2A või 2B kategooriasse oleneb selle ÜRO GHSi kriteeriumi tõlgendusest, mille alusel neid kahte kategooriat eristatakse, st 7. päeval peab mõju avalduma veel vastavalt ühel või kahel loomal kolmest; viimasel juhul klassifitseeritakse kemikaal 2A kategooriasse. *In vivo* uuringus kasutati kolme looma. Kõik näitajad peale sarvkesta läbipaistmatuse ja sidekesta punetuse ühel loomal saavutasid hiljemalt 7. päevaks nulltaseme. Ühel loomal, kes ei paranenud täielikult 7. päevaks, oli 7. päeval sarvkesta läbipaistmatuse aste 1 ja sidekesta punetuse aste 1, mis paranesid täielikult 14. päevaks (11).

Lühendid: CASi nr = Chemical Abstracts Service'i registrinumber

KATSE KÄIK

Rakkude monokihi valmistamine

15. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodi rakendamiseks tuleks kasutada küüliku sarvkesta rakkude SIRC-liini. Soovitatav on soetada SIRC-rakud usaldusväärsest rakupangast, näiteks USA tüüpkultuuride kollektsioonist (American Type Culture Collection), tootekood CCL60.

16. SIRC-rakke kasvatatakse 37 °C juures reguleeritud õhuniiskusega 5 % CO_2-sisaldusega atmosfääris kultuurikolvis, mis sisaldab kasvusöödet, mis koosneb Eagle'i essentsiaalsest minimaalsöötmest (MEM), millele on lisatud 10 % veise loote seerumit (FBS), 2 mM L-glutamiini, 50–100 ühikut/ml penitsilliini ja 50–100 µg/ml streptomütsiini. Rakud, mis on saavutanud kultuurikolvis konfluentsuse, eraldatakse trüpsiini etüleendiamiintetraäädikhappe lahusega, kasutada võib rakukaabitsat. Enne rutiinanalüüsis kasutamist kasvatatakse rakke (nt 2–3 passaaži) kultuurikolvis ning need ei tohiks pärast sulatamist läbida üle 25 passaaži.

17. Lühiajalise kokkupuute katses kasutamiseks valmis rakud külvatakse sobiva tihedusega 96 süvendiga plaatidesse. Kui kultuuri ruumala on 200 µl, on rakkude soovitatav külvitihedus $6{,}0 \times 10^3$ rakku süvendis, kui rakke kasutatakse neli päeva pärast külvamist, või $3{,}0 \times 10^3$ rakku süvendis, kui rakke kasutatakse viis päeva pärast külvamist. Lühiajalise kokkupuute katses kasutatavad rakud, mis külvatakse kasvusöötmesse sobiva tihedusega, saavutavad katse läbiviimise ajaks, st 4. või 5. külvijärgseks päevaks üle 80 % konfluentsuse.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete kasutamine

18. Uuritavate kemikaalide lahustamiseks või suspendeerimiseks tuleks esmajoones valida füsioloogiline lahus. Kui uuritavad kemikaalid lahustuvad füsioloogilises lahuses halvasti või neid ei saa selles vähemalt viieks

▼M8

minutiks lahustada või ühtlaselt suspendeerida, tuleks teise lahustina valida 5 % DMSO (CASi nr 67-68-5) sisaldusega füsioloogiline lahus. Nende uuritavate kemikaalide jaoks, mida ei saa vähemalt viieks minutiks lahustada või ühtlaselt suspendeerida ei füsioloogilises lahuses ega 5 % DMSO-sisaldusega füsioloogilises lahuses, kasutatakse kolmanda valikuna mineraalõli (CASi nr 8042-47-5).

19. Uuritavad kemikaalid lahustatakse või suspendeeritakse valitud lahustis ühtlaselt 5 % kontsentratsiooni (massiprotsent) juures ning valmistatakse järjestikuste 10-kordsete lahjendamiste teel 0,5 % ja 0,05 % kontsentratsiooniga lahused. Iga uuritava kemikaaliga viiakse katse läbi nii 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures. 96 süvendiga plaadis kasvatatud rakud viiakse toatemperatuuril viieks minutiks kokkupuutesse uuritava kemikaali lahuse või suspensiooniga, mille kontsentratsioon on kas 5 % või 0,05 % ja mida lisatakse 200 µl süvendi kohta. Uuritavaid kemikaale (ühe või mitme koostisainega ained või segud) käsitletakse nende puhtusastet arvestamata puhaste ainetena ning need lahustatakse või suspendeeritakse vastavalt meetodis esitatud juhistele.

20. Punktis 16 kirjeldatud kasvusöödet kasutatakse söötmega kontrolliks iga korduskatse igas plaadis. Peale selle tuleb rakud iga korduskatse igas plaadis viia kokkupuutesse ka lahusti kontrollproovidega. On kindlaks tehtud, et punktis 18 loetletud lahustitel ei ole kahjulikku mõju SIRC-rakkude eluvõimelisusele.

21. Lühiajalise kokkupuute katsemeetodi korral kasutatakse iga korduskatse igas plaadis positiivseks kontrolliks 0,01 % naatriumlaurüülsulfaadisisaldusega füsioloogilist lahust. Positiivse kontrolli rakkude eluvõimelisuse arvutamiseks peab iga korduskatse iga plaat hõlmama ka lahusti kontrollproovi füsioloogilise lahusega.

22. Tühiproov on vajalik optilise tiheduse kompensatsiooni määramiseks ja seda tuleks kontrollida süvendites, mis sisaldavad ainult fosfaadiga puhverdatud füsioloogilist lahust (PBS) ega sisalda kaltsiumi, magneesiumi ega rakke.

23. Igat proovi (uuritava kemikaali 5 % ja 0,05 % lahus, lahusti kontrollproov, söötme kontrollproov ja positiivne kontroll) tuleb igas korduskatses analüüsida kolme paralleelproovina, viies rakud toatemperatuuril viieks minutiks kokku 200 µl asjaomase uuritava või kontrollkemikaaliga.

24. Võrdlusained võimaldavad hinnata teatavasse kemikaali- või tooteklassi kuuluva uurimata kemikaali omadust põhjustada silmade ärritust või hinnata teatava silmi ärritava aine mõju tugevust teatavas ärritava toime vahemikus.

Raku eluvõimelisuse mõõtmine

25. Pärast kokkupuudet pestakse rakke kaks korda 200 µl PBSiga ja lisatakse 200 µl MTT lahust (0,5 mg MTTd 1 ml kasvusöötme kohta). Pärast kahetunnise reaktsiooniaja möödumist inkubaatoris (37 °C, 5 % CO_2) MTT lahus dekanteeritakse ja lisatakse MTT formasaani ekstraheerimiseks 200 µl 0,04 N vesinikkloriidhappe lahust isopropanoolis, lastakse lahusel 60 minutit pimedas toatemperatuuril seista ning mõõdetakse plaadilugeriga neelduvus MTT formasaani lahuses lainepikkusel 570 nm. Uuritavate kemikaalide segav mõju MTT-katses (värvainete või MTT otseste redutseerijate puhul) esineb ainult juhul, kui uuritavasse süsteemi jääb pärast kokkupuutejärgset pesu märkimisväärne kogus uuritavat kemikaali. Seda juhtub inimese kolmemõõtmelise rekonstrueeritud sarvkesta või inimese kolmemõõtmelise rekonstrueeritud epidermise kudede puhul, kuid lühiajalise kokkupuute katsemeetodis kasutatud kahemõõtmeliste rakukultuuride puhul on see tähtsusetu.

▼M8

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimismudel

26. Iga uuritava kemikaali kohta saadud optilise tiheduse (OD) väärtusi kasutatakse selleks, et arvutada rakkude eluvõimelisus lahusti kontrollproovi suhtes, mille puhul eluvõimelisuseks loetakse 100 %. Rakkude suhtelist eluvõimelisust väljendatakse protsentides ning see saadakse, jagades uuritava kemikaali optilise tiheduse väärtuse lahusti kontrollproovi omaga, kusjuures eelnevalt on neist mõlemast lahutatud tühiproovi optilise tiheduse väärtus.

$$Rakkude\ eluvõimelisus(\%) = \frac{(uuritava\ kemikaali\ OD_{570}) - (tühiproovi\ OD_{570})}{(lahusti\ kontrolli\ OD_{570}) - (tühiproovi\ OD_{570})} \times 100$$

Samamoodi väljendatakse protsentides rakkude suhtelist eluvõimelisust igas lahusti kontrollproovis ning see saadakse, jagades iga lahusti kontrollproovi optilise tiheduse väärtuse söötme kontrollproovi omaga, kusjuures eelnevalt on neist mõlemast lahutatud tühiproovi optilise tiheduse väärtus.

27. Läbi tuleb viia kolm sõltumatut korduskatset, millest igaüks toimub paralleelselt kolme süvendiga (*st* n=9). Rakkude suhtelise eluvõimelisuse aritmeetilise keskmise arvutamiseks kasutatakse sõltumatutel korduskatsetel iga uuritava kemikaali ja lahustiga kontrollprooviga kolmes süvendis saadud tulemuste aritmeetilist keskmist. Rakkude eluvõimelisuse lõplik aritmeetiline keskmine arvutatakse kolme sõltumatu korduskatse põhjal.

28. Rakkude eluvõimelisuse läviväärtused, mille järgi uuritavaid kemikaale, mis põhjustavad rasket silmakahjustust (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria), eristatakse uuritavatest kemikaalidest, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata kemikaal), on esitatud allpool.

Tabel 2

Lühiajalise kokkupuute katsemeetodi prognoosimismudel

Rakkude eluvõimelisus		ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane klassifikatsioon	Kohaldamine
5 % korral	0,05 % korral		
> 70 %	> 70 %	Kategooriata	Ained ja segud, välja arvatud: i) väga lenduvad ained aururõhuga üle 6 kPa ([1]) ja ii) tahked kemikaalid (ained ja segud) peale pindaktiivsete ainete ja ainul pindaktiivsetest ainetest koosnevate segude
≤ 70 %	> 70 %	Prognoosida ei ole võimalik	Ei kohaldata
≤ 70 %	≤ 70 %	1. kategooria	Ained ja segud ([2])

([1]) Segusid, mis sisaldavad üle 6 kPa aururõhuga aineid, tuleks hoolikalt hinnata, et vältida võimalikku alahindamist, ning see peab olema igal üksikjuhtumil põhjendatud.

([2]) Põhineb peamiselt ühe koostisosaga ainetega saadud tulemustel, kuigi leidub ka piiratud kogus andmeid segudega katsetamise kohta. See katsemeetod on siiski tehniliselt kohaldatav mitme koostisosaga ainete ja segude uurimiseks. Enne kui kasutada käesolevat meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

▼M8

Nõuetekohasuse kriteeriumid

29. Katsetulemused loetakse nõuetekohaseks, kui on täidetud kõik järgmised kriteeriumid.

a) Söötme kontrollproovi (kasvusööde, mida kokkupuutel kasutati) optiline tihedus peab pärast tühiproovi optilise tiheduse väärtuse lahutamist olema vähemalt 0,3;

b) Eluvõimelisus lahusti kontrollproovis peab olema vähemalt 80 %, võrreldes eluvõimelisusega söötme kontrollproovis. Kui igal korduskatsel kasutatakse mitut lahusti kontrollproovi, peab neist igaühes rakkude eluvõimelisus olema üle 80 %, et nende lahustitega analüüsitud uuritavate kemikaalide omadusi oleks võimalik nõuetekohaselt hinnata.

c) Positiivse kontrollprooviga (0,01 % naatriumlaurüülsulfaat) saadud rakkude eluvõimelisus võib varasemate uuringute keskväärtusest erineda kahe standardhälbe ulatuses. Positiivse kontrollproovi nõuetekohasuse ülem- ja alampiiri tuleb sageli, st iga kolme kuu möödudes ajakohastada, või tuleb laborites, kus katseid tehakse harva (st vähem kui kord kuus), iga kord teha ka nõuetekohane katse. Kui laboris ei viida läbi piisaval arvul eksperimente, et saavutada positiivse kontrollproovi tulemuste statistiliselt robustne jaotus, on lubatud kasutada meetodi väljatöötaja antud nõuetekohasuse ülem- ja alampiiri, st vahemikku 21,1–62,3 % vastavalt laboris aja jooksul kogutud andmetele, samas kui laborisisene jaotus tehakse kindlaks esimeste rutiinsete katsetega.

d) Kolmest sõltumatust korduskatsest saadud rakkude lõpliku eluvõimelisuse standardhälve peab nii uuritava kemikaali 5 % kui ka 0,05 % kontsentratsiooni juures jääma alla 15 %.

Kui üks või mitu nendest kriteeriumidest ei ole täidetud, tuleb tulemused kehtetuks lugeda ja läbi viia veel kolm sõltumatut korduskatset.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

30. Esitada tuleb iga korduskatse iga üksiksüvendi kohta saadud andmed (nt rakkude eluvõimelisuse väärtused) ning üldine keskväärtus, standardhälve ja klassifikatsioon.

Katseprotokoll

31. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Uuritav kemikaal ja kontrollained

— Ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;

— mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest (vt eespool), kättesaadavas ulatuses;

— füüsikaline olek, lenduvus, pH, log P, molekulmass, aineklass ja muud uuringu tegemisega seotud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;

▼**M8**

— puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

— töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

— säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses.

Katsetingimused ja -eeskirjad

— Sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

— kasutatud katsemeetodi kirjeldus;

— kasutatud rakuliin, selle päritolu, passaažide arv ja katses kasutatud rakkude konfluentsus;

— kasutatud katse-eeskirja üksikasjad;

— kordus- ja paralleelproovide arv;

— uuritava kemikaali kasutatud kontsentratsioonid (kui erinevad soovitatust);

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti valimise põhjendus;

— uuritava kemikaaliga kokkupuute kestus (kui erineb soovitatust);

— kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus;

— kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;

— viide aja jooksul kogutud positiivsete kontrollproovide tulemuste keskväärtusele ja standardhälbele;

— – labori kasutatud meetod, millega tõendatakse katsemeetodi kasutamise pädevust (nt pädevuse kontrolli ainetega katsetamine) või meetod, millega tõendatakse katsemeetodi korratavat toimivust ajas.

Tulemused

— Iga uuritava kemikaali ja kontrollaine ning iga uuritava kontsentratsiooni kohta tuleb tabeli kujul esitada optiline tihedus igas paralleelkatse süvendis, iga sõltumatu korduskatse optilise tiheduse väärtuste aritmeetiline keskmine, iga sõltumatu korduskatse rakkude eluvõimelisus protsentides ning kokku kolmes korduskatses saadud rakkude eluvõimelisuse (%) lõplik aritmeetiline keskmine ja standardhälve;

— söötme kontrollproovi, lahusti kontrollproovi ja positiivse kontrollproovi tulemused, mis tõendavad vastavust uuringu nõuetekohasuse kriteeriumidele;

— muude täheldatud toimete kirjeldus;

— tuletatud üldine/üldised klassifikatsioon(id) viitega kasutatud prognoosimudelile ja/või otsustamiskriteeriumidele.

▼**M8**

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. 5. täiendatud väljaanne, United Nations Publications, New York & Genf, 2013. ISBN: 978-92-1-117006-1. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott, L. *et al.* (2010), „A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches“, *Toxicol. in Vitro*, nr 24, lk 1–9.

(3) Mosmann, T. (1983). „Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays“, *J. Immunol. Methods*, nr 65, lk 55–63.

(4) Takahashi, Y. *et al.* (2008), „Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells“, *Toxicol. In Vitro*, nr 22, lk 760–770.

(5) Sakaguchi, H. *et al.* (2011), „Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals“, *Toxicol. In Vitro*, nr 25, lk 796–809.

(6) Kojima, H. *et al.* (2013), „Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals“, *Toxicol. In Vitro*, nr 27, lk 1855–1869.

(7) ICCVAM (2013), Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Kättesaadav aadressil [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Käesoleva lisa peatükk B.5 „Äge mürgisus: silmade ärritus/söövitus“.

(9) Saito, K. *et al* (2015), „Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures“,

(10) Mikkelson, T.J., Chrai, S.S. ja Robinson, J.R. (1973), „Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction“, *J. Pharm. Sci.*, lk 1 648–1 653.

(11) ECETOC (1998), Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brüssel, Belgia.

(12) Gautheron, P. *et al.* (1992). „Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy“, *Fundam. Appl. Toxicol.*, nr 18, lk 442–449.

(13) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(14) OECD (2017), Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M8**

Liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodiga saadud tulemuste ja nõuetekohaste võrdlusväärtuste kokkulangevuse määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks olulistest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (13).

Võrdlusaine: aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava kemikaaliga. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused; iv) teadaolevat toimet tõendavad andmed ja v) teadaolev mõjusus soovitavas reaktsioonitugevuse vahemikus.

Alt-üles lähenemisviis: etapiviisiline lähenemisviis, mida kasutatakse niisuguste uuritavate kemikaalide korral, mille puhul on põhjust arvata, et need ei vaja klassifitseerimist silmade ärrituse või raske silmakahjustusega seoses; nimetatud lähenemisviisi puhul eristatakse kõigepealt kemikaalid, mis ei vaja klassifitseerimist (tulemus on negatiivne), muudest kemikaalidest (tulemus on positiivne).

Kemikaal: aine või segu.

Silmade ärritus: muutuse tekkimine silmas pärast uuritava kemikaali silma eespinnale manustamist, seejuures on muutus 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult taandunud. Samatähenduslik mõistetega „pöörduv mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 2. kategooria“.

Valenegatiivsete tulemuste määr: kõikide selliste kemikaalide osakaal, mis peaksid andma positiivse tulemuse, kuid on katsemeetodit järgides andnud negatiivse tulemuse. See on üks katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja.

Valepositiivsete tulemuste määr: kõikide selliste kemikaalide osakaal, mis peaksid andma negatiivse tulemuse, kuid on katsemeetodit järgides andnud positiivse tulemuse. See on üks katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja.

Oht: niisuguse mõjuri või olukorra loomupärane omadus, mis võib avaldada kahjulikku toimet, kui organism, süsteem või (ala)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Söötme kontrollproov: töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Seda proovi analüüsitakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovide ja teiste kontrollproovidega, et teha kindlaks, kas lahusti mõjutab katsesüsteemi.

Segu: kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Ühe koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles ühe peamise koostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

MTT: 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine.

Mitme koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles rohkem kui ühe peamise koostisosa kontsentratsioon on $\geq$ 10 % ja $<$ 80 % (massiprotsendid). Mitme koostisosaga aine saadakse tootmisprotsessi käigus. Erinevus segu ja mitme koostisosaga aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosaga aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

▼M8

OD: optiline tihedus.

Positiivne kontrollproov: paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemide komponente ja mida on töödeldud ainega, mis teadaolevalt kutsub esile positiivse reaktsiooni. Selleks, et oleks võimalik hinnata positiivse kontrollproovi esilekutsutud reaktsiooni varieeruvust ajas, ei tohi positiivne reaktsioon olla ülemäära tugev.

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat mõju, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist mõju. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi täpsuse (vastavuse) aspekti (10).

Usaldusväärsus: iseloomustab katsemeetodi korratavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline korratavus ning laborisisene korduvus (13).

Tundlikkus: kõigi niisuguste positiivsete/reaktsioonivõimeliste kemikaalide osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (10).

Raske silmakahjustus: sellise koekahjustuse tekkimine silmas või selline tugev nägemisteravuse langus pärast seda, kui uuritavat kemikaali on manustatud silma eespinnale, mis ei ole 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult pöörduv. Samatähenduslik mõistetega „pöördumatu mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria“.

Lahusti/kandeaine kontrollproov: töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või kandeainet, ning mida analüüsitakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovide ja muude kontrollproovidega, et määrata kindlaks samas lahustis või kandeaines lahustatud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide nulljoonetase. Kui seda proovi analüüsitakse samaaegselt söötme kontrollprooviga, näitab see samuti, kas lahusti või kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Spetsiifilisus: kõigi niisuguste negatiivsete/mittereageerivate kemikaalide osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (13).

Aine: looduslik või tootmisprotsessi teel saadud keemiline element ja selle ühendid, kaasa arvatud stabiilsuse säilitamiseks vajalikud lisaained ja tootmisprotsessist tingitud lisandid, välja arvatud mis tahes lahusti, mida on võimalik aine stabiilsust vähendamata ja selle koostist muutmata eraldada.

Pindaktiivne aine: kemikaal, näiteks pesuaine, mis vähendab vedeliku pindpinevust ning muudab selle vahutavaks või tahket materjali läbivaks, seda nimetatakse ka märgavaks aineks.

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M8

Astmelise katsetamise strateegia: etapiviisi katsete tegemise strateegia, milles enne järgmise etapiga alustamist vaadatakse kindlaksmääratud korras läbi kogu uuritava kemikaali kohta olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse menetlust, et otsustada, kas teave on ohuklassi määramiseks piisav. Kui olemasoleva teabe põhjal saab otsustada uuritava kemikaali ärritava toime üle, ei ole täiendavaid katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa otsustada uuritava kemikaali ärritava toime üle, jätkatakse järjestikuste loomkatsete etapiti tegemist, kuni kemikaali saab üheselt klassifitseerida.

Ülalt-alla lähenemisviis: etapiviisiline lähenemisviis, mida kasutatakse niisuguste uuritavate kemikaalide korral, mille puhul on põhjust arvata, et need põhjustavad rasket silmakahjustust; nimetatud lähenemisviisi puhul eristatakse kõigepealt rasket silmakahjustust tekitavad kemikaalid (tulemus on positiivne) muudest kemikaalidest (tulemus on negatiivne).

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS (Globally Harmonized System)): süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (1).

ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria: vt „Raske silmakahjustus“.

ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 2. kategooria: vt „Silmade ärritus“.

ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata: kemikaalid, mis ei ole klassifitseeritud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. ega 2. kategooriasse (ega ÜRO GHSi 2A või 2B kategooriasse).

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

▼M8

B.69. **REKONSTRUEERITUD INIMESE SARVKESTA SARNASE EPITEELI (RhCE) KATSEMEETOD NENDE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA EGA MÄRGISTADA SEOSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 492 (2017). *Raske silmakahjustus* on Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtse ülemaailmse kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (ÜRO GHS (Globally Harmonized System) (1) ning Euroopa Liidu määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus) ([1]), esitatud määratluse kohaselt sellise koekahjustuse tekkimine silmas või selline tugev nägemisteravuse langus pärast seda, kui uuritavat kemikaali on manustatud silma eespinnale, mis ei ole 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult pöörduv. Samuti on ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohaselt *silmade ärritus* muutuste tekkimine silmas pärast uuritava kemikaali silma eespinnale manustamist, seejuures on muutus 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult taandunud. Raske silmakahjustust põhjustavad uuritavad kemikaalid klassifitseeritakse ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohasesse 1. kategooriasse ning silmade ärritust põhjustavad uuritavad kemikaalid ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohasesse 2. kategooriasse. Kemikaal, mida ei klassifitseerita seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega, on määratletud kui kemikaal, mis ei vasta ÜRO GHSi 1. või 2. (2A või 2B) kategooriasse klassifitseerimise nõuetele, see tähendab, et sellele viidatakse kui ÜRO GHSi kategooriata kemikaalile.

2. Rasket silmakahjustust / silmade ärritust tekitava toime hindamisel on tavaliselt kasutatud laboriloomi (katsemeetod B.5 (2)). Kõige asjakohasema katsemeetodi valimist ja selle kasutamist tuleks vaadelda raske silmakahjustuse ja silmade ärrituse põhjustamise uurimiseks ja hindamiseks kasutatavaid komplekssseid lähenemisviise käsitleva OECD juhenddokumendi (39) kontekstis.

3. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse *in vitro* meetodit, mis võimaldab kindlaks teha kemikaalid (ained ja segud), mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohaselt klassifitseerida ega märgistada. Meetodis kasutatakse rekonstrueeritud inimese sarvkesta sarnast epiteeli, mille histoloogilised, morfoloogilised, biokeemilised ja füsioloogilised omadused on ülimalt sarnased inimese sarvkesta epiteeli omadele. Valideeritud, teaduslikult põhjendatuiks arvatud ning katsemeetoditena B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) ja B.68 (6) vastu võetud on veel neli *in vitro* katsemeetodit, mis uurivad rasket silmakahjustust / silmade ärritust inimtervisega seotud näitajana.

4. Käesolev katsemeetod hõlmab kaht valideeritud katset, mille puhul kasutatakse müügil olevaid RhCE-mudeleid. Valideerimisuuringud silmade ärrituse / raske silmakahjustuse hindamiseks viidi läbi (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) EpiOcular™i silmaärrituse katse ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katse põhjal. Mõlemas katses kasutatakse katsesüsteemina müügil olevaid RhCE-koemudeleid, millele edaspidises tekstis viidatakse kui valideeritud võrdlusmeetoditele VRM1 ja VRM2 (VRM – Validated Reference Methods). Nende valideerimisuuringute ja seotud sõltumatu

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353/1, 31.12.2008).

▼M8

vastastikuse eksperdihinnangu (9, 12) põhjal tehti järeldus, et EpiOcular™i silmaärrituse katse ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse sobivad nende kemikaalide (nii ainete kui ka segude) korrektseks kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse ega raske silmakahjustusega ÜRO GHSi kohaselt klassifitseerida ja märgistada, ning soovitati kõnealuseid meetodeid kui selleks eesmärgiks sobivaid teaduslikult põhjendatud meetodeid (13).

5. Praegu ollakse üldiselt arvamusel, et lähitulevikus ei ole võimalik rasket silmakahjustust tekitava / silmi ärritava toime kogu ulatuse prognoosimisel eri kemikaaliklasside puhul ühegi *in vitro* katsemeetodiga täielikult asendada Draize'i *in vivo* silmakatset (2, 14). Kuid mitme alternatiivse katsemeetodi kombineerimisega (astmelise) katsetamise strateegiat (nt alt-üles või ülalt-alla lähenemisviisi) rakendades võib siiski olla võimalik Draize'i silmakatset (15) täielikult asendada. Alt-üles lähenemisviisi (15) tuleks kasutada siis, kui olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et kemikaal ei põhjusta piisavalt silma ärritust, et seda oleks vaja klassifitseerida; ülalt-alla lähenemisviisi (15) tuleks kasutada siis, kui olemasoleva teabe põhjal võib eeldada, et kemikaal põhjustab raske silmakahjustuse. EpiOcular™i silmaärrituse katset ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutavat silmaärrituse katset soovitatakse kasutada selleks, et teha täiendava katsetamiseta kindlaks need kemikaalid, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt klassifitseerida (kategooria puudub), kasutades neid näiteks Scott *et al*. soovitatud alt-üles / ülalt-alla lähenemisviisidele sarnastes katsestrateegiates, nt esimese etapina alt-üles lähenemisviisipuhul ja ühena viimastest etappidest ülalt-alla lähenemisviisi puhul (15). EpiOcular™i silmaärrituse katse ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse ei ole siiski ette nähtud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase 1. kategooria (raske silmakahjustus) ja 2. kategooria (silmade ärritus) eristamiseks. Selliseks eristamiseks peab katsestrateegias olema mõni muu etapp (15). Kui EpiOcular™i silmaärrituse katse või SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katsega on kindlaks tehtud, et uuritavat kemikaali on vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega klassifitseerida, on lõpliku järelduse (kas tegemist on ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooriata, 1. kategooria või 2. kategooria kemikaaliga) tegemiseks vaja täiendavaid katseid (*in vitro* ja/või *in vivo*), kasutades näiteks katsemeetodit B.47, B.48, B.61 või B.68.

6. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada eeskirja, mida kasutatakse, et hinnata uuritava kemikaali võimalikku ohtlikkust silmale selle võime põhjal kutsuda esile tsütotoksilisust RhCE-koemudelis; kõnealust võimet mõõdetakse MTT-katsega (16) (vt punkt 21). RhCE-koe eluvõimelisuse määramiseks pärast uuritava kemikaaliga kokkupuudet võrreldakse seda kudedega, mida on töödeldud negatiivse kontrollainega (saadakse eluvõimelisuse %), ning saadud tulemust kasutatakse, et prognoosida uuritava kemikaali võimalikku ohtlikkust silmale.

7. Kättesaadavad on toimivusnõuded (17), mis hõlbustavad EpiOcular™i silmaärrituse katsega või SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katsega sarnaste uute või modifitseeritud RhCE-põhiste *in vitro* katsemeetodite valideerimist kooskõlas OECD juhenddokumendis nr 34 (18) esitatud põhimõtetega, ning võimaldavad OECD katsejuhendit nr 492 õigeaegselt muuta, lisades sinna kõnealused meetodid. Andmete vastastikune tunnustamine vastavalt OECD kokkuleppele tagatakse vaid nende katsemeetodite puhul, mis on valideeritud kooskõlas toimivusnõuetega, kui need katsemeetodid on läbi vaadatud ja lisatud OECD poolt vastavasse juhendisse.

MÕISTED

8. Mõisted on esitatud 1. liites.

▼M8

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

9. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse kaubanduslikult saadaolevaid kolmemõõtmelisi RhCE-koemudeleid, mis on valmistatud kas inimese epidermise esmastest keratinotsüütidest (nt EpiOcular™ OCL-200) või inimese sarvkesta immortaliseeritud epiteelirakkudest (nt SkinEthic™ HCE/S). RhCE-koemudelid EpiOcular™ OCL-200 ja SkinEthic™ HCE/S sarnanevad *in vivo* sarvkesta kolmemõõtmelise struktuuriga epiteelile ning nende valmistamiseks kasutatakse huvipakkuva liigi rakke (19, 20). Peale selle mõõdetakse nende katsetega otseselt tsütotoksilisust, mis ilmneb kemikaali tungimisel läbi sarvkesta ning raku- ja koekahjustuste tekkides; tsütotoksilisusreaktsioon on aluseks üldisele *in vivo* katsel saadud tulemusele raske silmakahjustuse / silmade ärrituse kohta. Rakukahjustuse tekkimise mehhanismid võivad olla erinevad (vt punkt 20), kuid tsütotoksilisusel on koekahjustust põhjustanud füüsikalis-keemilistest protsessidest olenemata oluline või isegi peamine mehhanistlik roll kemikaali põhjustatud üldise reaktsiooni (raske silmakahjustus või silmade ärritus) määramisel, reaktsioon avaldub *in vivo* peamiselt sarvkesta läbipaistmatuse, vikerkestapõletiku, sidekesta punetuse ja/või sidekesta tursena.

10. Käesoleva katsemeetodi valideerimisuuringus uuriti katseliselt paljusid kemikaale, mis kuulusid mitmesse eri liiki ja kemikaaliklassi ning millel oli erinev molekulmass, log P, keemiline struktuur jne. EpiOcular™i silmaärrituse katse valideerimise andmebaas sisaldas kokku andmeid 113 kemikaali kohta, millel olid OECD rakendusega QSAR Toolbox tehtud analüüsi (8) kohaselt esindatud 95 erinevat funktsionaalrühma. Enamik neist kemikaalidest olid ühe koostisosaga ained, kuid uuringusse oli võetud ka mitu mitme koostisosaga ainet (sealhulgas 3 homopolümeeri, 5 kopolümeeri ja 10 kvaasipolümeeri). Füüsikalise oleku ja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooria järgi jagunesid 113 uuritud kemikaali järgmiselt: 13 vedelikku 1. kategooriast, 15 tahket ainet 1. kategooriast, 6 vedelikku 2A kategooriast, 10 tahket ainet 2A kategooriast, 7 vedelikku 2B kategooriast, 7 tahket ainet 2B kategooriast, 27 kategooriata vedelikku ja 28 kategooriata tahket ainet (8). SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katse valideerimise andmebaas sisaldas kokku andmeid 200 kemikaali kohta, milles esindatud 165 erinevat funktsionaalrühma (8, 10, 11). Enamik neist kemikaalidest olid ühe koostisosaga ained, kuid uuringusse oli võetud ka mitu mitme koostisosaga ainet (sealhulgas 10 polümeeri). Füüsikalise oleku ja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase kategooria järgi jagunesid 200 uuritud kemikaali järgmiselt: 27 vedelikku 1. kategooriast, 24 tahket ainet 1. kategooriast, 19 vedelikku 2A kategooriast, 10 tahket ainet 2A kategooriast, 9 vedelikku 2B kategooriast, 8 tahket ainet 2B kategooriast, 50 kategooriata vedelikku ja 53 kategooriata tahket ainet (10, 11).

11. Seda katsemeetodit saab kasutada ainete ja segude uurimiseks tahkete ainete, vedelike, pooltahkete ainete ja vahade puhul. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Tahked ained tuleks enne pealekandmist võimaluse korral peenestada peeneks pulbriks; proovi muud eeltöötlust ei ole vaja. Gaase ja aerosoole ei ole valideerimisuuringuga veel hinnatud. Kuigi on mõeldav, et neidki saab uurida RhCE-koemudeli abil, ei võimalda praegune katsemeetod gaaside ega aerosoolide uurimist.

12. Uuritavad kemikaalid, mis (iseloomulikult või pärast töötlemist) neelavad valgust MTT formasaaniga samas lainepikkuste vahemikus või suudavad vitaalvärvaine MTT-d otse redutseerida (MTT formasaaniks), võivad koe eluvõimelisuse mõõtmist segada ning siis on vaja kasutada kohandatud kontrollproove paranduste tegemiseks. Vajalike kohandatud kontrollproovide liik varieerub olenevalt uuritava kemikaali põhjustatud häire iseloomust ja MTT formasaani kvantitatiivse mõõtmise metoodikast (vt punkte 36–42).

▼**M8**

13. Eelvalideerimisel (21, 22) ja täielikus valideerimisuuringus (8, 10, 11) saadud tulemused näitasid, et nii EpiOcular™i silmaärrituse katse kui ka SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse on rakendatavad laboris, millel ei ole nimetatud analüüside tegemise kogemust, samuti on need korratavad nii laborisiseselt kui ka laboritevaheliselt. Kõnealuste uuringute kohaselt on 113 kemikaali kohta saadud andmete põhjal EpiOcular™i silmaärrituse katse eeldatav korratavuse suurusjärk prognooside kokkulangevuse järgi laborisisese korratavuse puhul 95 % ja laboritevahelise korratavuse puhul 93 %. 120 kemikaali kohta saadud andmete põhjal on SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katse eeldatav korratavuse suurusjärk prognooside kokkulangevuse järgi laborisisese korratavuse puhul 92 % ja laboritevahelise korratavuse puhul 95 %.

14. EpiOcular™i silmaärrituse katset saab kasutada niisuguste kemikaalide kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimissüsteemi järgi klassifitseerida. Võttes arvesse valideerimisuuringus saadud andmeid (8), on EpiOcular™i silmaärrituse katse kogutäpsus 80 % (112 kemikaali põhjal), tundlikkus 96 % (57 kemikaali põhjal), valenegatiivsete tulemuste määr 4 % (57 kemikaali põhjal), spetsiifilisus 63 % (55 kemikaali põhjal) ja valepositiivsete tulemuste määr 37 % (55 kemikaali põhjal), võrreldes võrdluskatsena kasutataval küüliku *in vivo* silmakatsel (katsemeetod B.5) (2, 14) saadud andmetega, mille põhjal loetletud tooted olid klassifitseeritud ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifikatsioonisüsteemi kohaselt. 97 vedel agrokeemiatoote uuringus EpiOcular™i silmaärrituse katsega leiti et katsemeetodi toimivus seda liiki segude puhul sarnaneb valideerimisuuringus leitud toimivusega (23). Nimetatud 97 toodet jagunesid järgmiselt: 21 toodet 1. kategooriast, 19 toodet 2A kategooriast, 14 toodet 2B kategooriast ja 43 kategooriata toodet, mis olid klassifitseeritud ÜRO GHSi klassifitseerimissüsteemi järgi võrdluskatsena kasutataval küüliku *in vivo* silmakatsel (katsemeetod B.5) (2, 14) saadud andmete alusel. Leiti, et kogutäpsus on 82 % (97 toote põhjal), tundlikkus 91 % (54 toote põhjal), valenegatiivsete tulemuste määr 9 % (54 toote põhjal), spetsiifilisus 72 % (43 toote põhjal) ja valepositiivsete tulemuste määr 28 % (43 toote põhjal) (23).

15. SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katset saab kasutada niisuguste kemikaalide kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimissüsteemi järgi klassifitseerida. Võttes arvesse valideerimisuuringus saadud andmeid (10, 11), on SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katse kogutäpsus 84 % (200 kemikaali põhjal), tundlikkus 95 % (97 kemikaali põhjal), valenegatiivsete tulemuste määr 5 % (97 kemikaali põhjal), spetsiifilisus 72 % (103 kemikaali põhjal) ja valepositiivsete tulemuste määr 28 % (103 kemikaali põhjal), võrreldes võrdluskatsena kasutataval küüliku *in vivo* silmakatsel (katsemeetod B.5) (2, 14) saadud andmetega, mille põhjal loetletud tooted olid klassifitseeritud ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifikatsioonisüsteemi kohaselt.

16. Mõlema RhCE-põhise katsemeetodiga nii ainete kui ka segude puhul korduvatel katsetel saadud valenegatiivsete tulemuste määrade alusel on üldine tõenäosus 12 %, et kemikaalid klassifitseeritakse Draize'i *in vivo* silmakatse tulemusena kas ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohasesse 2. kategooriasse või neil ÜRO GHSi ja CLP-määrusekohane kategooria puudub. seda põhjustab meetodile iseloomulik katsesisene hajuvus (24). Mõlema RcHE-põhise katsemeetodiga nii ainete kui ka segude puhul saadud valepositiivsete tulemuste määrad ei ole selle katsemeetodi kontekstis kriitilised, sest kõiki uuritavaid kemikaale, mille puhul koe eluvõimelisus on võrdne kindlaksmääratud lävivääртusega (vt punkt 44) või sellest väiksem, tuleb järgmiseks uurida muude *in vitro* katsemeetoditega või viimase võimalusena, olenevalt regulatiivsetest nõuetest, katsetes küülikutega kooskõlas järjestikuse katsete tegemise strateegia ning tõendite kaalukuse lähenemisviisiga. Neid katsemeetodeid võib kasutada iga tüüpi kemikaalide puhul, kusjuures negatiivse tulemuse võib aktsepteerida kui tõendi, et kemikaali ei ole vaja seoses silmaärrituse või

▼M8

raske silmakahjustusega klassifitseerida (ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane kategooria puudub). Kui EpiOcular™i silmaärrituse katset ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutavat silmaärrituse katset hakatakse kasutama muu kui ÜRO GHSi / CLP-määruse klassifitseerimisskeemiga seoses, tuleks eelnevalt konsulteerida asjakohaste reguleerivate asutustega.

17. Selle katsemeetodi kasutamist piirab asjaolu, et see ei võimalda vahet teha silmade ärritusel / pöörduval mõjul silmale (2. kategooria) ja tõsisel silmakahjustusel / pöördumatul mõjul silmale (1. kategooria), nagu need on määratletud ÜRO GHSis ja CLP-määruses, ega ka silma ärritaval (valikuline 2A kategooria) ja silma kergelt ärritaval (valikuline 2B kategooria) kemikaalil, nagu need on määratletud ÜRO GHSis (1). Selleks on vajalik täiendav uuring muude *in vitro* katsemeetoditega.

18. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse terminit „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava terminina ([1]) ja see ei ole seotud RhCE-põhise katsemeetodi kohaldatavusega ainete ja/või segude uurimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

19. Uuritav kemikaal kantakse vähemalt kahele kolmemõõtmelisele RhCE-koemudelile ning pärast kokkupuute ja töötlemise järgset ajavahemikku mõõdetakse koe eluvõimelisus. RhCE-koed rekonstrueeritakse inimese epidermise esmastest keratinotsüütidest või inimese sarvkesta immortaliseeritud epiteelirakkudest, mida on mitme päeva jooksul kasvatatud, et saada mitmekihiline, ülimalt diferentseerunud lameepiteel, mis morfoloogiliselt sarnaneb inimese sarvkestal leiduvale. EpiOcular™i RhCE-koemudel koosneb vähemalt kolmest eluvõimelisest rakukihist ja sarvestumata pinnast, mille struktuur on sarvkesta sarnane ja analoogne *in vivo* esinevale. SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli RhCE-koemudel koosneb vähemalt neljast eluvõimelisest rakukihist, sealhulgas kolumnaarsed basaalrakud, sarvkesta pealispinnaalused üleminekurakud ja pindmised lamerakud, ning sarnaneb tavalisele inimese sarvkesta epiteelile (20, 26).

20. Kemikaalist põhjustatud raske silmakahjustus / silmade ärritus, mis avaldub *in vivo* peamiselt sarvkesta läbipaistmatuse, vikerkestapõletiku, sidekesta punetuse ja/või sidekesta tursena, on selliste järjestikuste muutuste tagajärg, mis algavad kemikaali tungimisega läbi sarvkesta ja/või sidekesta ja rakukahjustuse tekitamisega. Rakukahjustuse tekkimise mehhanismid võivad olla erinevad, sealhulgas rakumembraani lüüs (nt pindaktiivsete ainete, orgaaniliste lahustite toimel), makromolekulide (eelkõige valkude) koaguleerumine (nt pindaktiivsete ainete, orgaaniliste lahustite, leeliste ja hapete toimel), lipiidide seebistumine (nt leeliste toimel) ning alküülimine või muud kovalentsed vastastikmõjud makromolekulidega (nt pleegitite, peroksiidide ja alküülijate toimel) (15, 27, 28). Siis on näidatud, et tsütotoksilisusel on koekahjustust põhjustanud füüsikalis-keemilistest protsessidest olenemata oluline või isegi peamine mehhanistlik roll kemikaali põhjustatud üldise reaktsiooni (raske silmakahjustus või silmade ärritus) määramisel (29, 30). Peale selle määratakse kemikaali võime põhjustada rasket silmakahjustust / silmade ärritust põhimõtteliselt esialgse vigastuse ulatuse järgi (31), mis on vastavuses rakkude hävimise (29) ning sellest tulenevate reaktsioonide ja

([1]) 2013. aasta juunis lepiti OECD ühiskoosolekul kokku, et võimaluse korral kasutatakse uute ja ajakohastatud OECD katsejuhendites uurimisobjektile viitamiseks järjepidevamalt terminit „uuritav kemikaal“.

▼M8

lõpptulemuse ulatusega (32). Seega mõjutavad silma kergelt ärritavad kemikaalid üldiselt üksnes sarvkesta pindmist epiteeli, kergelt ja mõõdukalt ärritavad kemikaalid kahjustavad põhimõtteliselt epiteeli ja pindmist stroomat ning tugevalt ärritavad kemikaalid kahjustavad epiteeli, strooma süvakihte ja kohati sarvkesta endoteeli (30, 33). RhCE-koemudeli eluvõimelisuse mõõtmine pärast pindmist kokkupuudet uuritava kemikaaliga, et teha kindlaks kemikaalid, mida ei ole vaja seoses raske silmakahjustuse / silmade ärritusega klassifitseerida (ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane kategooria puudub), põhineb eeldusel, et kõik kemikaalid, mis põhjustavad raske silmakahjustuse või silmade ärrituse, põhjustavad sarvkesta epiteelis ja/või sidekestas tsütotoksilisust.

21. Tavapäraselt mõõdetakse RhCE-koe eluvõimelisust vitaalvärvaine MTT [3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine; CASi number 298-93-1] ensümaatilise muundamise järgi siniseks MTT formasaansoolaks, mis pärast koest ekstraheerimist määratakse kvantitatiivselt (16). Kemikaalid, mida ei ole vaja ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt klassifitseerida ja märgistada (kategooria puudub), on kemikaalid, mis uurimisel ei vähenda koe eluvõimelisust allapoole määratud läviväärtust (st EpiOcular™i silmaärrituse katsel ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutavat silmaärrituse katsel EITL ([1]) koe eluvõimelisus > 60 % või SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutavat silmaärrituse katsel EITS ([2]) > 50 %) (vt punkt 44).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

22. Enne RhCE-koemudeliga tehtavate katsete rutiinset kasutamist regulatiivsel eesmärgil tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, prognoosides õigesti tabelis 1 loetletud pädevuse tõendamise kemikaalide omadused. Need kemikaalid valiti välja valideeritud võrdlusmeetodite valideerimisuuringutes kasutatud kemikaalide seast (8, 10, 11). Valikus on võimaluste piires esindatud järgmiste omadustega kemikaalid: i) neil erinevad füüsikalised olekud; ii) nad esindavad *in vivo* raske silmakahjustuse / silmade ärrituse reaktsioonide täit vahemikku võrdluskatsena kasutataval küüliku *in vivo* silmakatsel (katsemeetod B.5) (2, 14) saadud kvaliteetsete andmete ning ÜRO GHSi klassifitseerimissüsteemi (st 1. kategooria, 2A, 2B kategooria või klassifitseerimata) ja CLP-määruse kohase klassifitseerimissüsteemi (st 1. või 2. kategooria või kategooria puudub) alusel; iii) nad esindavad mitmesuguseid aluseid *in vivo* klassifitseerimiseks (24, 25); iv) kuuluvad samadesse kemikaaliklassidesse, mida kasutati valideerimisuuringus (8, 10, 11); v) neis on hästi esindatud mitmesugused funktsionaalrühmad (8, 10, 11); vi) nende keemiline ehitus on hästi teada (8, 10, 11); vii) nad on värvilised ja/või MTT otsesed redutseerijad; viii) nad andsid valideerimisel RhCE-koemudelitega katsemeetodeid kasutades korratavad tulemused; ix) nende omadused prognoositi valideerimisuuringutes RhCE-koemudeleid kasutavate katsemeetoditega õigesti; x) nad esindavad RhCE-koemudelit kasutava katsemeetodiga saadud kvaliteetsete andmete kohaselt *in vitro* reaktsioonide täit vahemikku (eluvõimelisus 0 kuni 100 %) xi) nad on müügil ja xii) nendega ei kaasne ülemääraseid soetamis- ja/või kõrvaldamiskulusid. Kui mõnda loetletud kemikaali ei ole saada või seda ei saa muul õigustatud põhjusel kasutada, võib kasutada muud eespool kirjeldatud kriteeriumidele vastavat kemikaali näiteks valideeritud võrdlusmeetodi valideerimisel kasutatud kemikaalide hulgast. Sellised kõrvalekalded peavad siiski olema põhjendatud.

([1]) EITL: silmaärrituse katse vedelikega, kui kasutatakse SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli

([2]) EITS: silmaärrituse katse tahkete ainetega, kui kasutatakse SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli

▼M8

Tabel 1

Pädevuse tõendamise kemikaalide loend

Keemiline nimetus	CASi nr	Funktsionaalrühm (1)	Füüsikaline olek	Eluvõimelisus meetodiga VRM1 (%) (2)	Eluvõimelisus meetodiga VRM2 (%) (3)	Prognoos VRM-meetodiga	MTT redutseerija	Segava värvusega
***In vivo* 1. kategooria** (4)								
Metüültioglükolaat	2365-48-2	Karboksüülhappeester, tioalkohol	Vedel	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Prognoosida ei ole võimalik	Jah (tugev)	Ei
Hüdroksüetüülakrülaat	818-61-1	Akrülaat, alkohol	Vedel	7,5 ± 4,7 (5)	1,6 ± 1,0	Prognoosida ei ole võimalik	Ei	Ei
2,5-dimetüül-2,5-heksaandiool	110-03-2	Alkohol	Tahke	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Prognoosida ei ole võimalik	Ei	Ei
Naatriumoksalaat	62-76-0	Oksokarboksüülhape	Tahke	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Prognoosida ei ole võimalik	Ei	Ei
***In vivo* 2A kategooria** (4)								
N,N″-bis(4-klorofenüül)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraasatetradekaandiimiidamiidi di-D-glükonaat (20 % vesilahus) (6)	18472-51-0	Aromaatne heterotsükliline haliid, arüülhaliid, dihüdroksüülrühm, guanidiin	Vedel	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Prognoosida ei ole võimalik	Ei	Jah (nõrk)
Naatriumbensoaat	532-32-1	Arüül, karboksüülhape	Tahke	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Prognoosida ei ole võimalik	Ei	Ei
***In vivo* 2B kategooria** (4)								
Dietüültoluamiid	134-62-3	Bensamiid	Vedel	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Prognoosida ei ole võimalik	Ei	Ei
2,2-dimetüül-3-metüleenbitsüklo[2.2.1]heptaan	79-92-5	Alkaan, hargnev, tertsiaarse süsinikuga; alkeen; bitsüklohepptaan; sildtsüklilised ühendid; tsükloalkaan	Tahke	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Prognoosida ei ole võimalik	Ei	Ei
***In vivo* kategooria puudub** (4)								
1-etüül-3-metüülimidasooliummetüülsulfaat	342573-75-5	Alkoksürühm; ammooniumsool; arüülrühm; imidasool; sulfaat	Vedel	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Kategooria puudub	Ei	Ei

▼M8

Keemiline nimetus	CASi nr	Funktsionaalrühm (1)	Füüsikaline olek	Eluvõimelisus meetodiga VRM1 (%) (2)	Eluvõimelisus meetodiga VRM2 (%) (3)	Prognoos VRM-meetodiga	MTT redutseerija	Segava värvusega
Dikaprülüüleeter	629-82-3	Alkoksürühm; eeter	Vedel	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Kategooria puudub	Ei	Ei
Piperonüülbutoksiid	51-03-6	Alkoksürühm; bensodioksool; bensüülrühm; eeter	Vedel	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Kategooria puudub	Ei	Ei
Hüdrogeenitud kastoorõli polüetüleenglükoolester (PEG-40)	61788-85-0	Atsülaalrühm, alkohol; allüülrühm, eeter	Viskoosne	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Kategooria puudub	Ei	Ei
1-(4-klorofenüül)-3-(3,4-diklorofenüül)karbamiid	101-20-2	Aromaatne heterotsükliline haliid, arüülhaliid, Karbamiidi derivaadid	Tahke	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Kategooria puudub	Ei	Ei
2,2′-metüleen-bis-(6-(2*H*-bensotriasool-2-üül)-4-(1,1,3,3-tetrametüülbutüül) fenool	103597-45-1	Alkaan, hargnev, kvaternaarse süsinikuga; kondenseerunud tsüklitega aromaatne ühend; kondenseerunud küllastunud heterotsüklid; kinoidühendite prekursor; *tert*-butüülrühm	Tahke	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Kategooria puudub	Ei	Ei
Kaaliumtetrafluoroboraat	14075-53-7	Anorgaaniline sool	Tahke	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Kategooria puudub	Ei	Ei

Lühendid:

CASi nr – Chemical Abstracts Service'i number; ÜRO GHS – Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (1); VRM1 – valideeritud võrdlusmeetod (*Validated Reference Method*), EpiOcular™i silmaärrituse katse; VRM2 – valideeritud võrdlusmeetod (*Validated Reference Method*), SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse; segava värvusega – ühendi värvus segab MTT formasaani neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist.

(1) Funktsionaalrühm on omistatud vastavalt hierarhilisele analüüsile OECD rakendusega Toolbox 3.1 (8).

(2) Põhineb EpiOcular™i silmaärrituse katsega saadud tulemustel EURL ECVAMi ja ühenduse Cosmetics Europe tehtud silmaärrituse katsemeetodi valideerimisuuringus (8).

(3) Põhineb SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katsega valideerimisuuringus (10, 11) saadud tulemustel.

(4) Põhineb küüliku *in vivo* silmakatse (katsemeetod B.5 / OECD katsejuhend nr 405) (2, 14) tulemustel ja selles kasutatakse ÜRO GHSi klassifikatsiooni.

(5) Põhineb konsortsiumi CEFIC *in vitro* silmaärrituse katsete tegemise strateegia (CON4EI) uuringus saadud tulemustel.

(6) Klassifitseerimine 2A või 2B kategooriasse oleneb selle ÜRO GHSi kriteeriumi tõlgendusest, mille alusel neid kahte kategooriat eristatakse, st 7. päeval peab mõju avalduma veel vastavalt ühel või kahel loomal kolmest; viimasel juhul klassifitseeritakse kemikaal 2A kategooriasse. *In vivo* uuringus kasutati kolme looma. Kõik näitajad peale sarvkesta läbipaistmatuse ühel loomal saavutasid hiljemalt 7. päevaks nulltaseme. Ühel loomal, kes ei paranenud täielikult 7. päevaks, oli 7. päeval sarvkesta läbipaistmatuse aste 1, mis paranes täielikult 9. päevaks.

23. Pädevuse tõendamise katsete osana soovitatakse kasutajal pärast kudede saamist kontrollida nende kaitsekihiomaduste vastavust RhCE-koemudeli tootja kirjeldusele (vt punktid 25, 27 ja 30). See on eriti oluline pärast kudede pikaajalist või kaugvedu. Kui katsemeetod on edukalt omandatud ning oskus seda kasutada on saavutatud ja tõendatud, ei ole katse rutiinse kasutamise puhul selline kontrollimine igapäevaselt vajalik. Katse rutiinse kasutamise puhul soovitatakse siiski jätkata kaitsekihiomaduste kontrollimist korrapäraste ajavahemike järel.

▼M8

KATSE KÄIK

24. Selle katsemeetodiga praegu hõlmatud katsed on teaduslikult põhjendatud EpiOcular™i silmaärrituse katse ja SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse, millele viidatakse kui valideeritud võrdlusmeetoditele (vastavalt VRM1 ja VRM2). RhCE-koemudelit kasutava katsemeetodi standardeeskiri on kättesaadav ja seda tuleb järgida katsemeetodi juurutamisel ja kasutamisel laboris (34, 35). Järgmistes punktides ja 2. liites kirjeldatakse RhCE-koemudelit kasutavate katsete peamisi osi ja eeskirju.

RHCE-KOEMUDELIT KASUTAVA KATSEMEETODI OSAD

Üldtingimused

25. Sarvkesta epiteelile sarnaneva kolmemõõtmelise koe rekonstrueerimiseks tuleb kasutada asjakohaseid inimese rakke; kude peaks koosnema progressiivselt kihistunud, kuid mitte sarvestunud rakkudest. RhCE-koemudel valmistatakse plaatidel, millel on sünteetiline poorne membraan, millest toitained läbi liiguvad ja rakkudesse suunduvad. Rekonstrueeritud sarvkesta epiteelile sarnanevas koes peab olema mitu kihti eluvõimelisi sarvestumata epiteelirakke. RhCE-koemudeli epiteelipind peaks olema otseses kokkupuutes õhuga, et võimaldada otsest pindmist kokkupuudet uuritavate kemikaalidega sarnaselt sellele, kuidas sarvkesta epiteeli kokkupuude toimuks *in vivo*. RhCE-koemudel peab moodustama funktsionaalse kaitsekihi, mis on piisavalt tugev, et takistada tsütotoksiliste võrdlusainete, nt Triton X-100 või naatriumdodetsüülsulfaadi kiiret läbitungimist. Nimetatud kaitsekihina toimimist tuleks tõendada ja seda saab hinnata kas sellise kokkupuuteaja määramisega, mille jooksul võrdlusaine teatava kindla kontsentratsiooni (nt 100 µl 0,3-mahuprotsendilist Triton X-100) juures vähendab koe eluvõimelisust 50 % võrra (ET_{50}), või sellise kontsentratsiooni määramisega, mille juures võrdlusaine vähendab kindla kokkupuuteaja (nt 30-minutine töötlemine 50 µl naatriumdodetsüülsulfaadiga) jooksul koe eluvõimelisust 50 % võrra (IC_{50}). RhCE-koemudel peab olema selline, et uuritav kemikaal ei saaks tungida eluskudedesse ümber serva, vastasel korral ei oleks tegemist sarvkesta ja uuritava aine kokkupuute õige mudeliga. RhCE-koemudeli valmistamiseks kasutatavad inimese rakud ei tohi olla saastunud bakterite, viiruste, mükoplasma ega seentega. Koemudeli steriilsust peaks kontrollima tarnija, kes jälgib, et mudel ei oleks saastatud seente ega bakteritega.

Funktsionaalsed tingimused

Eluvõimelisus

26. Koe eluvõimelisuse määramiseks kasutatakse MTT-katset (16). RhCE-koemudeli eluvõimelised rakud redutseerivad vitaalvärvaine MTT siniseks MTT formasaaniks, mis sadeneb ning ekstraheeritakse seejärel koestisopropanooliga (või sarnase lahustiga). Ekstraheeritud MTT formasaani saab määrata kvantitatiivselt kas neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisega või HPLC-/UPLC-spektromeetrilise ühendmeetodiga (36). Puhta ekstraheerimislahusti optiline tihedus peab olema piisavalt madal, väiksem kui 0,1. RhCE-koemudeli kasutajad peaksid tagama, et iga kasutatav RhCE-koemudeli partii vastab kindlaksmääratud negatiivse kontrollproovi kriteeriumidele. Negatiivse kontrollproovi optilise tiheduse lubatavad vahemikud valideeritud võrdlusmeetodite puhul on esitatud tabelis 2. HPLC-/UPLC-spektromeetrilise ühendmeetodi kasutaja peaks negatiivse kontrollproovi nõuetekohasuse kriteeriumina kasutama tabelis 2 esitatud negatiivse kontrollproovi optilise tiheduse vahemikke. Katseprotokollis peaks olema dokumenteeritud, et negatiivse võrdlusainega töödeldud koed on kultuuris stabiilsed (annavad sarnaseid koe eluvõimelisuse mõõtmistulemusi) katses kasutatava kokkupuuteaja jooksul. Samasugust eeskirja peaks

▼M8

koepartii kvaliteedikontrolli osana järgima koemudeli tootja, kuid sellisel juhul võivad kehtida teised nõuetekohasuse kriteeriumid kui tabelis 2 esitatud. RhCE-koemudeli väljatöötaja/tarnija peaks kindlaks määrama negatiivse kontrollproovi optilise tiheduse väärtuste (kvaliteedikontrolli katsetingimuste korral) nõuetekohasuse vahemiku (ülem- ja alampiiri).

Tabel 2

Negatiivse kontrollproovi optilise tiheduse väärtuste nõuetekohasuse vahemik (katse läbiviijatele)

Katse	Vastuvõetav alampiir	Vastuvõetav ülempiir
EpiOcular™i silmaärrituse katse (OCL-200) – VRM1 (nii vedelate kui ka tahkete ainetega töötlemisel)	> 0,8 ([1])	> 2,5
SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (HCE/S) – VRM2 (nii vedelate kui ka tahkete ainetega töötlemisel)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Selle vastuvõetavuspiiri juures arvestatakse võimalikku pikaajalist vedu või ladustamist (nt kauem kui 4 päeva), mis ei ole osutunud katsemeetodi toimivust mõjutavaks (37).

Toimimine kaitsekihina

27. RhCE-koemudel peab olema piisavalt paks ja tugev, et takistada tsütotoksiliste võrdlusainete kiiret läbitungimist, seda hinnatakse ET_{50} (Triton X-100) või IC_{50} (naatriumdodetsüülsulfaat) abil (tabel 3). RhCE-koemudeli väljatöötaja/müüja peab lõppkasutajale kudesid tarnides tõendama iga RhCE-koemudeli partii toimivust kaitsekihina (vt punkt 30).

Morfoloogia

28. RhCE-koemudeli histoloogilisel uuringul peab see osutuma olevaks inimese sarvkesta epiteeli sarnase struktuuriga (sealhulgas vähemalt kolm eluvõimeliste epiteelirakkude kihti ja sarvestumata pind). VRMide puhul on sobiv morfoloogiline struktuur väljatöötaja/tarnija poolt kindlaks määratud ning seetõttu ei pea katsemeetodi kasutaja selle omadusi iga kasutatava koepartii juures uuesti tõendama.

Korratavus

29. Katsemeetodiga peavad positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide tulemused olema ajas korratavad.

Kvaliteedikontroll

30. RhCE-koemudelit tuleks kasutada üksnes siis, kui selle väljatöötaja/tarnija tõendab, et kõik kasutatavad RhCE-koemudelipartiid vastavad toote kindlaksmääratud kvaliteedikriteeriumidele, mille seas kõige olulisemad on eluvõimelisuse (punkt 26) ja kaitsekihina toimivuse (vt punkti 27) kriteeriumid. RhCE-koemudeli väljatöötaja/tarnija peaks kindlaks määrama ET_{50}- või IC_{50}-meetodiga (vt punktid 25 ja 26) mõõdetava kaitsekihina toimivuse nõuetekohasuse vahemiku (ülem- ja alampiiri). ET_{50} ja IC_{50} nõuetekohasuse vahemikud, mida RhCE-koemudelite (kasutatavad VRMides) väljatöötaja/tarnija kasutab partii kvaliteedikontrolli kriteeriumina, on esitatud tabelis 3. RhCE-koemudeli väljatöötaja/tarnija peab esitama katsemeetodi kasutajale andmed, mis tõendavad vastavust kõigile toote kvaliteedikriteeriumidele, nii et meetodi kasutaja saaks selle teabe katseprotokolli lisada. Ainult kõigile toote kvaliteedikriteeriumidele vastavate kudedega saadud tulemused sobivad nende kemikaalide kohta usaldusväärsete prognooside tegemiseks, mida ei ole vaja seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt klassifitseerida ega märgistada.

▼M8

Tabel 3

Partii kvaliteedi kontrollimise kriteerium

Katse	Vastuvõetav alampiir	Vastuvõetav ülempiir
EpiOcular™i silmaärrituse katse (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3-mahuprotsendilist Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (HCE/S) – VRM2 (30-minutine töötlemine 50 µl naatriumdodetsüülsulfaadiga)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete kasutamine

31. Iga uuritava kemikaali ja iga kontrollainega tuleks iga kord kasutada vähemalt kaht koe paralleelproovi. Kasutatakse kaht erinevat töötlemismeetodit, üht vedelate ja teist tahkete uuritavate kemikaalide puhul (34, 35). Mõlema meetodi ja töötlemismeetodi korral tuleb koemudeli pinda enne uuritava kemikaaliga töötlemist niisutada kaltsiumi- ja magneesiumvaba Dulbecco fosfaadiga puhverdatud füsioloogilise lahusega (Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBS), et jäljendada inimsilma niiskustingimusi. Kudede töötlemine algab kokkupuutesse viimisega uuritava(te) kemikaali(de) ja kontrollainetega. Mõlemas valideeritud võrdlusmeetodis tuleb mõlema töötlemismeetodi puhul kanda piisav kogus uuritavat kemikaali või kontrollainet ühtlaselt epiteeli pinnale, vältides lõpmatut annust (vt punktid 32 ja 33) (liide 2).

32. Uuritavaid kemikaale, mida 37 °C juures või madalamal temperatuuril saab pipeteerida (vajaduse korral kolbpipetti kasutades), käsitletakse valideeritud võrdlusmeetodites vedelikena, muul juhul tuleb neid käsitleda tahkete ainetena (vt punkt 33). Valideeritud võrdlusmeetodites levitatakse vedelad uuritavad kemikaalid ühtlaselt koe pinnale (st kantakse peale vähemalt 60 µl pinna cm^2 kohta) (vt liidet 2) (33, 34). Plaadile kantavate väikeste ruumalade tõttu ilmneda võivat kapillaarjõudu (pindpinevusjõudu) tuleks võimalikult palju vältida, et tagada õige annustamine koele. Vedela uuritava kemikaaliga töödeldud kudesid inkubeeritakse 30 minutit rakkude kasvatamise standardtingimustes (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %). Kokkupuuteaja lõppedes tuleb vedel uuritav kemikaal ja kontrollained koe pinnalt hoolikalt eemaldada, loputades ohtra Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBSiga toatemperatuuril. Loputusetapile järgneb kokkupuutejärgne sukeldamine värskesse söötmesse toatemperatuuril (et eemaldada igasugune koesse imendunud uuritav kemikaal) eelnevalt kindlaks määratud ajavahemikuks, mis varieerub olenevalt kasutatavast valideeritud võrdlusmeetodist. Kokkupuutejärgset inkubeerimist värskes söötmes rakkude kasvatamise standardtingimustes enne MTT-katse tegemist rakendatakse üksnes VRM1 korral (vt liide 2) (34, 35).

33. Uuritavaid kemikaale, mida temperatuuril kuni 37 °C pipeteerida ei saa, käsitletakse valideeritud võrdlusmeetodites tahkete ainetena. Pealekantava uuritava kemikaali kogus peaks olema piisav, et katta kogu koepind, st peale tuleb kanda vähemalt 60 mg ainet pinna cm^2 kohta (liide 2). Võimaluse korral tuleks tahket ainet alati katsetada peene pulbri kujul. Tahke uuritava kemikaaliga töödeldud kudesid inkubeeritakse eelnevalt kindlaks määratud ajavahemiku (oleneb kasutatavast valideeritud võrdlusmeetodist) jooksul rakkude kasvatamise standardtingimustes (vt liide 2) (34, 35). Kokkupuuteaja lõppedes tuleb tahke uuritav kemikaal ja kontrollained koe pinnalt hoolikalt eemaldada, loputades ohtra Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBSiga toatemperatuuril. Loputusetapile järgneb kokkupuutejärgne sukeldamine

▼M8

värskesse söötmesse toatemperatuuril (et eemaldada igasugune koesse imendunud uuritav kemikaal) eelnevalt kindlaks määratud ajavahemikuks, mis varieerub olenevalt kasutatavast valideeritud võrdlusmeetodist, ning kokkupuutejärgne inkubeerimine värskes söötmes rakkude kasvatamise standardtingimustes enne MTT-katse tegemist (vt liide 2) (34, 35).

34. Iga analüüsitsükkel peaks sisaldama ühtlasi ka negatiivset ja positiivset kontrollproovi, millega tõendatakse, et kudede eluvõimelisus (määratakse negatiivse kontrollprooviga) ja tundlikkus (määratakse positiivse kontrollprooviga) jäävad aja jooksul kogutud andmete põhjal kindlaks määratud nõuetekohasesse vahemikku. Samaaegselt analüüsitav negatiivne kontrollproov annab samuti lähtetaseme (koe eluvõimelisus 100 %) uuritava kemikaaliga töödeldud kudede suhtelise eluvõimelisuse arvutamiseks protsentides (%eluvõimelisust$_{uuritav}$). Valideeritud võrdlusmeetoditega kasutamiseks soovitatav positiivne kontrollaine on puhas metüülatsetaat (CASi nr 79-20-9, saab osta nt Sigma-Aldrichist, katalooginr 45997, vedelik). Valideeritud võrdlusmeetoditega VRM1 ja VRM2 kasutamiseks soovitatavad negatiivsed kontrollained on vastavalt ülipuhas H_2O ja Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBS. Neid kasutati kontrollainetena valideeritud võrdlusmeetodite valideerimisuuringutes ja nende kohta on olemas kõige rohkem aja jooksul kogutud andmeid. Sobivate alternatiivsete positiivsete ja negatiivsete kontrollainete kasutamine peab olema teaduslikult ja piisavalt põhjendatud. Negatiivsete ja positiivsete kontrollainetega tuleb katse teha sama(de) katse-eeskirja(de) järgi, mida kasutatakse analüüsitsüklis olevate uuritavate kemikaalide puhul (nt vedelike ja tahkete ainete puhul). Sellele peaks järgnema töötlemine kokkupuutesse viimise teel, loputamine, kokkupuutejärgne sukeldamine ja vajaduse korral kokkupuutejärgne inkubeerimine, nagu kirjeldatud vedelate uuritavate kemikaalidega paralleelselt samas analüüsitsüklis kasutatavate kontrollainete puhul (vt punkt 32) ja tahkete uuritavate kemikaalidega paralleelselt samas analüüsitsüklis kasutatavate kontrollainete puhul (vt punkt 33), enne kui tehakse MTT-katse (vt punkt 35) (34, 35). Ühest negatiivsete ja positiivsete kontrollproovide komplektist piisab kõigi samas analüüsitsüklis uuritavate samas olekus (vedelad või tahked) kemikaalide jaoks.

Koe eluvõimelisuse mõõtmine

35. MTT-katse on standarditud kvantitatiivne meetod (16), mida tuleks käesoleva katsemeetodi puhul kasutada koe eluvõimelisuse mõõtmiseks. Meetodit saab kasutada kolmemõõtmelises koemudelis. MTT-katse tehakse vahetult pärast kokkupuutejärgse inkubatsiooniperioodi lõppemist. Valideeritud võrdlusmeetodite puhul asetatakse RhCE-koemudeli proov rakkude kasvatamise standardtingimustes 180±15 minutiks 0,3 ml MTT-lahusesse, mille kontsentratsioon on 1 mg/ml. RhCE-koemudeli eluvõimelised rakud redutseerivad vitaalvärvaine MTT siniseks sadenevaks MTT formasaaniks. Seejärel ekstraheeritakse sadenenud sinine MTT formasaan koest sobiva koguse isopropanooliga (või sarnase lahustiga) (34, 35). Vedelate kemikaalide uurimiseks kasutatud kudede puhul tuleks ekstraheerida nii koe pealt kui ka alt, kuid tahkete kemikaalide ja värviliste vedelike uurimiseks kasutatud kudede puhul tuleks ekstraheerida ainult koe alt (et minimeerida ekstraheerimiseks kasutatava isopropanoolilahuse võimalikku saastumist igasuguse uuritava kemikaaliga, mis võib olla koesse jäänud). Niisuguste vedelate kemikaalide uurimiseks kasutatud kudede puhul, mida ei saa hõlpsasti maha pesta, võib samuti ekstraheerida üksnes koe alt. Samaaegselt uuritud negatiivse ja positiivse kontrollaine proove tuleb töödelda sarnaselt uuritava kemikaali proovidega. Ekstraheeritud MTT formasaani võib kvantitatiivselt määrata kas neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmisega lainepikkusel 570 nm, kasutades spektririba laiust kuni ± 30 nm, või HPLC-/UPLC-spektrofotomeetrilisel ühendmeetodil (vt punkt 42) (11, 36).

▼**M8**

36. Uuritava kemikaali optilised omadused või selle keemiline reaktsioon MTTga võib MTT formasaani mõõtmist segada ja põhjustada vea koe eluvõimelisuse hindamisel. Uuritava kemikaalid võivad MTT formasaani mõõtmist segada, redutseerides MTT siniseks MTT formasaaniks ja/või olles segava värvusega, st uuritav kemikaal neelab tavaolekus või töötlemisprotsessi tõttu samas lainepikkuste vahemikus kui MTT formasaan (st 570 nm ümbruses). Enne katse läbiviimist tuleks teha eelkontroll, et teha kindlaks võimalikud MTT otsesed redutseerijad ja/või segava värvusega kemikaalid, samuti tuleks kasutada täiendavaid kontrollproove, et leida niisuguste kemikaalide põhjustatud võimalikud häired ja neid korrigeerida (vt punktid 37–41). See on eriti oluline, kui konkreetsest uuritavat kemikaali ei saa loputades RhCE-koemudelist täielikult eemaldada või kui see läbib sarvkesta epiteeliga sarnase koe ja esineb seetõttu RhCE-koemudelis MTT-katse tegemise ajal. Nende MTT formasaaniga samas lainepikkuste vahemikus valgust neelavate uuritavate kemikaalide puhul, mis ei võimalda tugeva segava mõju tõttu (st tugeva neelduvuse tõttu lainepikkusel 570±30 nm) MTT-formasaani neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist, võib MTT formasaani sisalduse mõõtmiseks kasutada HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit (vt punktid 41 ja 42) (11, 36). Üksikasjalik kirjeldus, kuidas tuvastada MTT otsene redutseerimine ja värviliste ainete segav mõju ning teha parandusi nende arvestamiseks, on esitatud valideeritud võrdlusmeetodite standardeeskirjades (34, 35). Samuti on III ja IV liites esitatud vastavalt VRM1- ja VRM2-meetodi puhul illustreerivad vooskeemid, millest juhinduda MTT otseste redutseerijate ja/või segava värvusega kemikaalide kindlakstegemisel ja nendega tegelemisel.

37. MTT formasaaniga samas lainepikkuste vahemikus valgust neelavate (loomulikus olekus või pärast töötlemist) uuritavate kemikaalide võimaliku segava mõju kindlakstegemiseks ning täiendavate kontrollproovide vajalikkuse üle otsustamiseks lisatakse uuritavat kemikaali vette ja/või isopropanooli ning inkubeeritakse sobiva aja jooksul toatemperatuuril (vt liide 2) (34, 35). Kui VRM1-meetodi puhul neelab vees ja/või etanoolis lahustatud uuritav kemikaal küllaldaselt valgust vahemikus 570±20 nm (vt liide 3) või VRM2-meetodi puhul saadakse uuritava kemikaali segamisel veega värviline lahus (vt liide 4), segab uuritav kemikaal eeldatavalt MTT formasaani neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist ning teha tuleks täiendavaid kontrollkatseid värvainetega või tuleks kasutada HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit – sel juhul ei ole nimetatud kontrollkatsete tegemine vajalik (vt punkte 41 ja 41 ning III ja IV liidet) (34, 35). Neelavuse (optilise tiheduse) mõõtmise korral tuleb iga uuritavat kemikaali kanda vähemalt kahele elujõulise koe paralleelproovile, millega tehakse läbi kogu katse käik, kuid MTTga inkubeerimise etapis inkubeeritakse neid MTT asemel söötmega, et saada kontrollproov, mille eluskudedes on mittespetsiifiline värvus (NSC_{elus}) (34, 35). Katse NSC_{elus}-kontrollprooviga tuleb läbi viia paralleelselt uuritava värvilise kemikaali prooviga ning korduvate katsete korral tuleb eluskudede bioloogilise varieeruvuse tõttu koos iga tehtava katsega (igas analüüsitsüklis) analüüsida ka eraldi NSC_{elus}-kontrollproovi. Koe tegelik eluvõimelisus arvutatakse järgmiselt: segava uuritava kemikaaliga kokku puutunud ja MTT-lahusega inkubeeritud eluskudedega saadud eluvõimelisuse protsent ($\%eluvõimelisust_{uuritav}$) miinus segava uuritava kemikaaliga kokku puutunud ning söötmega ja ilma MTTta inkubeeritud eluskudedega saadud mittespetsiifiline värvus ($\%NSC_{elus}$), mis saadakse paralleelselt selle katse läbiviimisega, mille tulemused vajavad korrigeerimist, st koe tegelik eluvõimelisus = $[\%eluvõimelisust_{uuritav}] - [\%NSC_{elus}]$.

38. MTT otseste redutseerijate kindlakstegemiseks tuleb iga uuritavat kemikaali lisada värskelt valmistatud MTT-lahusele. MTT-lahusele lisatakse sobiv kogus uuritavalt kemikaali ning segu inkubeeritakse rakkude kasvatamise

▼M8

standardtingimustes ligikaudu 3 tundi (vt III ja IV liide) (34, 35). Kui uuritavat kemikaali sisaldav MTT-segu (või mittelahustuvate kemikaalide korral suspensioon) muutub siniseks/lillaks, võib eeldada, et uuritav kemikaal redutseerib otseselt MTTd ning olenemata sellest, kas kasutatakse neelavuse (optilise tiheduse) mõõtmist või HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit, tuleb mitteeluvõimelise RhCE-koemudeliga toimimist täiendavalt kontrollida. Täiendav toimivuskontroll tehakse surnud kudedega, millel on üksnes metaboolne jääkaktiivsus, kuid mis imavad ja seovad uuritavat kemikaali sarnaselt eluvõimeliste kudedega. VRM1-meetodi puhul saadakse surnud koed madalal temperatuuril hoides (edaspidi „külmutades saadud surnud koed“). VRM2-meetodi puhul saadakse surnud koed pikaajalisel (vähemalt 24±1 tundi) hoidmisel vees, millele järgneb säilitamine madalal temperatuuril (edaspidi „vees saadud surnud koed“). Iga MTT-d redutseeriv uuritav kemikaal kantakse vähemalt kahele surnud loe paralleelproovile, mis läbivad kogu katse käigu, et saada kontrollproov, milles MTT redutseerimine on mittespetsiifiline (NSMTT) (34, 35). Piisab ühest NSMTT-kontrollproovist iga uuritava kemikaali kohta, olenemata sellest, kui palju üksikkatseid/katsetsükleid tehakse. Koe tegelik eluvõimelisus arvutatakse järgmiselt: MTT redutseerijaga kokku puutunud eluskudedega saadud eluvõimelisuse protsent (%eluvõimelisust$_{uuritav}$) miinus sama MTT redutseerijaga kokku puutunud surnud kudedega saadud MTT redutseerimine, mis arvutatakse negatiivse kontrollproovi suhtes, mida analüüsitakse paralleelselt korrigeerimist vajavate tulemustega katse läbiviimisega, st koe tegelik eluvõimelisus = [%eluvõimelisust$_{uuritav}$] − [%NSMTT].

39. Kui on selgunud, et uuritav kemikaal on nii segava värvusega (vt punkt 37) kui ka MTT otsene redutseerija (vt punkt 38), on neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmise korral peale eelmistes punktides kirjeldatud NSMTT- ja NSC$_{elus}$-kontrollproovide vajalik ka kolmas kontrollproovide komplekt. See on tavaline tumeda värvusega uuritavate kemikaalide puhul, mis neelavad valgust lainepikkuste vahemikus 570±30 nm (nt sinine, lilla, must), sest nende loomulik värv takistab nende MTT otsese redutseerimise võime hindamist vastavalt punktis 38 kirjeldatule. Selline olukord nõuab automaatselt nii NSMTT- kui ka NSC$_{elus}$-kontrollproovide kasutamist. Uuritavaid kemikaale, millega viiakse läbi nii NSMTT- kui ka NSC$_{elus}$-kontrollproovid, võivad absorbeerida ja siduda nii elus kui ka surnud loed. Seega võib juhtuda, et NSMTT-kontrollproov ei aita parandustes arvestada mitte ainult uuritava kemikaali MTT otsese redutseerimise võimet, vaid ka uuritava kemikaali surnud kudedesse absorbeerumisel ja seal püsimisel tekkivat segavat värvust. See võib põhjustada segavast värvusest tingitud vigade topeltparandusi, sest uuritava kemikaali elusas koes absorbeerumisest ja seal püsimisest tingitud värvuse häirivat mõju korrigeeritakse juba NSC$_{elus}$-kontrollproovi järgi. Et vältida segavast värvusest tingitud vigade topeltparandusi, on vaja teha kolmas kontrollkatse, millega analüüsitakse mittespetsiifilist värvust surnud kudedes (NSC$_{surnud}$) (vt III ja IV liide) (34, 35). Uuritavat kemikaali kantakse vähemalt kahele surnud koe paralleelproovile, millega tehakse läbi kogu katse käik, kuid MTTga inkubeerimise etapis inkubeeritakse neid MTT lahuse asemel söötmega. Piisab ühest NSC$_{surnud}$-kontrollproovist iga uuritava kemikaalikohta, olenemata sellest, kui palju üksikkatseid/katsetsükleid tehakse, kuid kõnealust kontrollproovi tuleks uurida paralleelselt NSMTT-kontrollprooviga ning kasutada mõlemas sama koepartiid. Koe tegelik eluvõimelisus arvutatakse järgmiselt: uuritava kemikaaliga kokku puutunud eluskudedega saadud eluvõimelisuse protsent (%eluvõimelisust$_{uuritav}$) miinus %NSMTT miinus %NSC$_{elus}$ pluss segava värvusega uuritava kemikaaliga kokku puutunud ning söötmega ja ilma MTTta inkubeeritud surnud kudedega saadud mittespetsiifilise värvuse %, mis arvutatakse negatiivse kontrollproovi suhtes, mida analüüsitakse paralleelselt korrigeerimist vajavate tulemustega katse läbiviimisega, st koe tegelik eluvõimelisus = [%eluvõimelisust$_{uuritav}$] − [%NSMTT] − [%NSC$_{elus}$] + [%NSC$_{surnud}$].

▼M8

40. Oluline on arvestada, et mittespetsiifiline MTT redutseerimine ja mittespetsiifilise värvuse häiriv mõju võivad suurendada koeekstrakti optilist tihedust (kui mõõdetakse neelduvust) nii, et see jääb ülespoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku, ning et mittespetsiifiline MTT redutseerimine võib suurendada koeekstraktis sisalduva MTT formasaani piigi pindala (kui mõõdetakse HPLC-/UPLC-spektromeetrilise ühendmeetodiga) nii, et see jääb ülespoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku. Seetõttu on oluline et iga labor määraks näiteks MTT formasaaniga (CASi nr 57360-69-7, saab osta nt Sigma-Aldrichist, katalooginr M2003) kindlaks oma spektrofotomeetri optilise tiheduse / piigi pindala lineaarsusvahemiku, enne kui alustab uuritavate kemikaalide analüüsimist regulatiivsel eesmärgil.

41. Neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmine spektrofotomeetriga on asjakohane MTT otseste redutseerijate ning segava värvusega uuritavate kemikaalide hindamisel, kui MTT formasaaniga mõõtmisel täheldatud segav mõju ei ole väga tugev (st uuritava kemikaaliga saadud koeekstraktide optilised tihedused ilma MTT otsest redutseerimist ja/või värvuse segavat mõju arvestavate parandusteta on spektrofotomeetri lineaarsusvahemikus). Sellegipoolest tuleb ettevaatlikult suhtuda nende uuritavate kemikaalide puhul saadud tulemustesse, mille negatiivse kontrollproovi tulemus on %NSMTT ja/või % $NSC_{elus} \geq 60$ % (VRM1, ja VRM2 vedelike analüüsimise metoodika) või 50 % (VRM2 tahkete ainete analüüsimise metoodika), sest need on kindlaksmääratud läviväärtused, mille järgi valideeritud võrdlusmeetodites eristatakse klassifitseeritud ja klassifitseerimata kemikaale (vt punkt 44). Neelduvust (optilist tihedust) ei saa siiski mõõta, kui MTT formasaani sisalduse mõõtmist segav mõju on liiga tugev (st põhjustab uuritavate koeekstraktide korrigeerimata optiliste tiheduste sattumist väljapoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku). Neid uuritavaid kemikaale, mis on värvilised või muutuvad värviliseks kokkupuutel vee või isopropanooliga ja segavad liiga tugevalt MTT formasaani neelduvuse (optilise tiheduse) mõõtmist, saab siiski analüüsida HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit kasutades (vt III ja IV liidet). HPLC-/UPLC-aparatuur võimaldab MTT formasaani enne selle kvantitatiivset määramist kemikaalist eraldada (36). Sel põhjusel ei ole HPLC-/UPLC-spektromeetrist ühendmeetodit kasutades vaja analüüsida NSC_{elus}- või NSC_{surnud}-kontrollproove olenemata sellest, missugust kemikaali uuritakse. Siiski tuleks uurida NSMTT-kontrollproove, kui on kahtlus, et uuritav kemikaal redutseerib otseselt MTTd (toimides punktis 38 kirjeldatu kohaselt). Samuti tuleks NSMTT-kontrollproove kasutada värviliste (iseloomuliku või veega kokkupuutel tekkiva värvusega) uuritavate kemikaalide puhul, kui värvus takistab hinnata nende võimet otseselt MTTd redutseerida (nimetatud kontrollproovide kasutamist on kirjeldatud punktis 38). Kui MTT formasaani sisalduse mõõtmiseks kasutatakse HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit, arvutatakse koe eluvõimelisus (protsentides) uuritava kemikaaliga kokku puutunud elusa koega saadud MTT formasaani piigi pindala protsendina paralleelse negatiivse kontrollprooviga saadud MTT formasaani piigi suhtes. Nende uuritavate kemikaalide puhul, mis on võimelised otseselt MTT redutseerima, arvutatakse koe tegelik eluvõimelisus järgmiselt: % $Eluvõimelisust_{uuritav}$ miinus %NSMTT, nagu on kirjeldatud punkti 38 viimases lauses. Lõpuks tuleb märkida, et neid otseseid MTT redutseerijaid (mis võivad olla ka segava värvusega), mis jäävad kudedesse pärast töötlemist püsima ja redutseerivad MTTd nii tugevalt, et see põhjustab uuritavate koeekstraktide optiliste tiheduste (kui mõõdetakse optilist tihedust) või piigi pindalade (kui kasutatakse HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit) sattumist väljapoole spektrofotomeetri lineaarsusvahemikku, ei saa analüüsida RhCE-katsemeetoditega, kuigi neid esineb eeldatavast väga harva.

42. HPLC-/UPLC-spektromeetrilist ühendmeetodit võib kasutada MTT formasaani sisalduse mõõtmiseks igat tüüpi uuritava kemikaali korral (värvilised, värvitud, MTT redutseerijad ja mitteredutseerijad) (11, 36). Kuna HPLC-/UPLC-spektrofotomeetria aparatuurid on erinevad, ei ole igal kasutajal lihtne luua süsteemis täpselt samasugused tingimused. Enne

▼M8

HPLC-/UPLC-spektromeetria aparatuuri kasutamist koeekstraktidest pärit MTT formasaani kvantitatiivseks mõõtmiseks tuleb tõendada aparatuuri nõuetekohasust; selleks peavad olema täidetud mitme standardse kvalifikatsiooninäitajaga seotud nõuetekohasuse kriteeriumid, mille aluseks on näitajad ja kriteeriumid, mida on kirjeldatud USA Toidu- ja Ravimiameti juhendis bioanalüütilise meetodi valideerimise kohta tööstuses (36, 38). Need põhinäitajad ja nende nõuetekohasuse kriteeriumid on esitatud 5. liites. Kui 5. liites määratletu nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse HPLC-/UPLC-fotomeetriaaparatuur nõuetekohaseks ning see on valmis MTT formasaani sisalduse mõõtmiseks käesolevas katsemeetodis kirjeldatud katsetingimuste juures.

Nõuetekohasuse kriteeriumid

43. Igas analüüsitsüklis, kus kasutakse kvaliteedikontrolli (vt punkt 30) läbinud RhCE-koepartiisid, peab negatiivse kontrollainega töödeldud kudede optiline tihedus kajastama kudede veo-, vastuvõtu- ja katse-eeskirjakohaste töötluste järgset kvaliteeti ega tohi jääda väljapoole varem kindlaksmääratud piire, mis on esitatud tabelis 2 (vt punkt 26). Samuti peab positiivse kontrollainega, nt metüülatsetaadiga töödeldud kudede keskmine eluvõimelisus negatiivse kontrollprooviga võrreldes olema < 50 %, kui järgitakse VRM1-meetodi vedelike või tahkete ainete katse-eeskirja, ja ≤ 30 % (vedelikel) või ≤ 20 % (tahketel ainetel), kui kasutatakse VRM2-meetodit; see näitaja kirjeldab kudede võimet reageerida ärritavale uuritavale kemikaalile katsemeetodiga ettenähtud tingimustes (34, 35). Uuritava kemikaalide ja kontrollainetega töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvus peab jääma vastuvõetavatesse piiridesse (st kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus peab olema alla 20 % või ei tohi kolme paralleelse koeprooviga saadud tulemuste standardhälve ületada 18 %). Kui analüüsitsüklisse võetud negatiivse või positiivse kontrollprooviga saadud tulemus jääb väljapoole vastuvõetavaid piire, loetakse analüüsitsükkel ebakvaliteetseks ja seda tuleb korrata. Kui uuritava kemikaalige töödeldud paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste varieeruvus jääb väljapoole vastuvõetavaid piire, loetakse katse ebakvaliteetseks ja katset uuritava kemikaaliga tuleb korrata.

Tulemuste tõlgendamine ja prognoosimismudel

44. Iga uuritava kemikaaliga töödeldud paralleelsete koeproovide ekstraktidega saadud optilise tiheduse väärtuste / piikide pindalade järgi arvutatakse protsentides koe keskmine eluvõimelisus (paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste keskväärtus) normaliseerituna negatiivse kontrollproovi järgi, mille väärtuseks võetakse 100 %. Koe eluvõimelisuse (protsentides) läviväärtused nende uuritavate kemikaalide kindlakstegemiseks, mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane kategooria puudub), on esitatud tabelis 4. Tulemusi tuleb seega tõlgendada järgmiselt:

— uuritav kemikaal määratletakse ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohast klassifitseerimist ja märgistamist mittevajava kemikaalina (kategooria puudub), kui koe keskmine eluvõimelisus (protsentides) pärast kemikaaliga kokkupuudet ja kokkupuutejärgset inkubeerimist on suurem kui (>) koe eluvõimelisuse (protsentides) kindlaksmääratud läviväärtus, mis on esitatud tabelis 4. Sellisel juhul ei ole vaja täiendavaid katseid teiste katsemeetoditega;

▼M8

— kui koe keskmine eluvõimelisus (protsentides) pärast kemikaaliga kokkupuudet ja kokkupuutejärgset inkubeerimist on väiksem kui koe eluvõimelisuse (protsentides) kindlaksmääratud lävi väärtus või sellega võrdne (≤), ei ole võimalik prognoose teha, nagu näidatud tabelis 4. Sellisel juhul on vaja täiendavaid kaitset teiste katsemeetoditega, sest RhCEd kasutavad katsemeetodid annavad teatava hulga valepositiivseid tulemusi (vt punktid 14–15) ega suuda eristada URO GHSi ja CLP-määruse kohastesse kategooriatesse 1 ja 2 kuuluvaid kemikaale (vt punkt 17)

Tabel 4

Prognoosimismudelid ÜRO GHSi ja CLP-määruse klassifikatsiooni järgi

VRM	Kategooriata	Prognoosida ei ole võimalik
VRM1 – EpiOcular™i silmaärrituse katse (mõlemad katse-eeskirjad)	Koe keskmine eluvõimelisus > 60 %	Koe keskmine eluvõimelisus ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (katse-eeskiri vedelike korral)	Koe keskmine eluvõimelisus > 60 %	Koe keskmine eluvõimelisus ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (katse-eeskiri tahkete ainete korral)	Koe keskmine eluvõimelisus > 50 %	Koe keskmine eluvõimelisus ≤ 50 %

45. Üksainus katse vähemalt kahe paralleelse koeprooviga uuritava kemikaali kohta peaks olema piisav, kui tulemus on ühene. Piiripealse tulemuse puhul, nagu lahkuminevad tulemused paralleelproovide mõõtmisel ja/või keskmine eluvõimelisuse protsent 60 ± 5 % (VRM1 ja VRM2 vedelike korral) või 50 ± 5 % (VRM2 tahkete ainete korral), tuleks kaaluda teise ja isegi kolmanda katse läbiviimist, kui kaks esimest katset annavad vastuolulise tulemuse.

46. Kui see on asjakohane ja õigustatud, võib teatavat liiki segude puhul kaaluda teistsuguste koe eluvõimelisuse (protsentides) lävi väärtuste kasutamist, millega eristatakse klassifitseeritud ja klassifitseerimata uuritavad kemikaalid, et suurendada katsemeetodi üldist toimivust seda liiki segude korral (vt punkt 14). Võrdluskemikaalid võivad aidata hinnata tundmatu uuritava kemikaali või tooteklassi võimet põhjustada rasket silmakahjustust / silmade ärritust või hinnata klassifitseeritud kemikaali võimalikku suhtelist toksilisust silmade suhtes teatavas positiivsete reaktsioonide vahemikus.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmed

47. Iga analüüsitsüklis oleva paralleelse koeprooviga saadud andmed (nt uuritavate kemikaalide ja kontrollainete optilise tiheduse väärtused / piikide pindalad ja arvutatud koe eluvõimelisuse (protsentides) andmed ning RhCE-katsemeetodi kohane lõplik prognoos) esitatakse tabelina iga uuritava kemikaali kohta, samuti tuleb vajaduse korral esitada korduskatsetel saadud andmed. Peale selle tuleb esitada kudede keskmine eluvõimelisus (protsentides) ja kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus (kui n = 2 paralleelset koeproovi) või iga uuritava kemikaali ja kontrollainega saadud tulemuste standardhälve (kui n ≥ 3 paralleelset koeproovi). Kui uuritud kemikaali puhul täheldati segavat mõju MTT formasaani sisalduse mõõtmisele MTT otsese redutseerimise tõttu ja/või segavat värvust, tuleb iga niisuguse kemikaali puhul esitada sellekohased andmed.

Katseprotokoll

48. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

▼**M8**

Uuritav kemikaal

Ühest koostisosast koosnev aine:

— kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;

— füüsikaline olek, lenduvus, pH, log P, molekulmass, aineklass ja muud uuringu tegemisega seotud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;

— puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

— töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

— säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest (vt eespool), kättesaadavas ulatuses;

— füüsikaline olek ja muud uuringu tegemisega seotud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;

— puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

— töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

— säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses.

Positiivsed ja negatiivsed kontrollained

— Kemikaali identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muud identifikaatorid;

— füüsikaline olek, lenduvus, molekulmass, aineklass ja muud uuringu tegemisega seotud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kättesaadavas ulatuses;

— puhtus, lisandite keemiline määratlus, kui see on asjakohane ja praktiliselt teostatav jne;

— töötlemine enne katset, kui asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

— säilitamise tingimused ja stabiilsus säilitamisel, kättesaadavas ulatuses;

— muu negatiivse kontrollaine kui ülipuhta H_2O või Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBSi kasutamise põhjendus, kui see on asjakohane;

— muu positiivse kontrollaine kui puhta metüülatsetaadi kasutamise põhjendus, kui see on asjakohane;

— viide varasematele positiivse ja negatiivse kontrollproovi tulemustele, mis tõendavad sobivaid analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriume.

Teave sponsori ja katselabori kohta

— Sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress.

— *Kasutatud RhCE-koemudel ja katse-eeskiri (koos valikute põhjendustega, kui see on asjakohane)*

▼**M8**

Katsemeetodi tingimused

— Kasutatud RhCE-koemudel, sealhulgas partii number;

— MTT formasaani kvantitatiivseks määramiseks kasutatud lainepikkus ja spektririba laius (kui asjakohane) ning mõõteseadme (nt spektrofotomeetri) lineaarsusvahemik;

— MTT formasaani kvantitatiivse määramise meetodi kirjeldus;

— kasutatud HPLC-/UPLC-fotomeetriaaparatuuri kirjeldus, kui asjakohane;

— kogu täiendav teave kasutatud konkreetse RhE-koemudeli ja selle toimivuse kohta. See hõlmab vähemalt järgmist:

i) eluvõimelisus kvaliteedi kontrollil (tarnija andmed);

ii) eluvõimelisus katsemeetodiga nõutavates tingimustes (kasutaja andmed);

iii) kaitsekihina toimivuse kontroll;

iv) morfoloogiaandmed, kui on olemas;

v) reprodutseeritavus ja prognoosivõime;

vi) muude RhCE-koemudeli kvaliteedi kontrollide andmed, kui on olemas;

— viide varasematele andmetele RhCE-koemudeli kohta. See hõlmab vähemalt järgmist: kvaliteedikontrolli andmete nõuetekohasus, arvestades varasemaid partii andmeid;

— kinnitus, et katselabor on enne katsemeetodi rutiinset kasutamist tõendanud oma pädevust asjaomaseid kemikaale analüüsides.

Analüüsiseeria ja katse nõuetekohasuse kriteeriumid

— Positiivsete ja negatiivsete kontrollproovidega saadud tulemuste keskväärtused ja nõuetekohased vahemikud, mille aluseks on aja jooksul kogutud andmed;

— positiivsel ja negatiivsel kontrollkatsel paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste lubatav varieeruvus;

— uuritava kemikaaliga paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste lubatav varieeruvus.

Katse käik

— Kasutatud katse-eeskirja üksikasjad;

— uuritava kemikaali ja kontrollainete kasutatud doosid;

— kokkupuute, kokkupuutejärgse sukeldatuse ja inkubeerimise kestus ja temperatuur nende ajal (kui asjakohane);

— kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus;

▼M8

— otseste MTT redutseerijate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollproovid, kui asjakohane;

— kasutatud paralleelsete koeproovide arv uuritava kemikaali kohta ja kontrollproovid (positiivne kontrollproov, negatiivse kontrollproov, NSMTT, NSC_{elus} ja NSC_{surnud}, kui asjakohane).

Tulemused

— Tabeli kujul esitatud andmed igas analüüsitsüklis ja paralleelmõõtmises olnud iga uuritava kemikaali ja kontrollaine kohta (kaasa arvatud korduskatsete andmed, kui see on asjakohane), sealhulgas optilise tiheduse väärtus või MTT formasaani piigi pindala, koe eluvõimelisus (protsentides), koe keskmine eluvõimelisus (protsentides), paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste erinevus või standardhälve ning lõplik prognoos;

— kui see on asjakohane, siis otseselt MTT redutseerivate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollproovide tulemused, sealhulgas optilise tiheduse väärtus või MTT formasaani piigi pindala, % NSMTT, $\%NSC_{elus}$, $\%NSC_{surnud}$, paralleelsete koeproovidega saadud tulemuste erinevus või standardhälve, lõplik korrigeeritud koe eluvõimelisus (protsentides) ja lõplik prognoos;

— uuritava(te) kemikaali(de)ga ja kontrollainetega saadud tulemuste võrdlus analüüsitsükli ja katsete nõuetekohasuse kriteeriumidega;

— muude täheldatud mõjude (nt kudede värvumine värvilise uuritava kemikaali tõttu) kirjeldus.

Tulemuste arutelu

Järeldused

KIRJANDUS

(1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO), „United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)“, ST/SG/AC.10/30/Rev 6, 6., täiendatud väljaanne, United Nations, New York ja Genf, 2015. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Käesoleva lisa peatükk B.5 „Äge mürgisus: silmade ärritus/söövitus“.

(3) Käesoleva lisa peatükk B.47, „Veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega“.

(4) Käesoleva lisa peatükk B.48, „Isoleeritud kanasilma katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida“.

(5) Käesoleva lisa peatükk B.61, „Fluorestseiini lekke katsemeetod silmi söövitavate ja tugevalt ärritavate kemikaalide kindlakstegemiseks“.

▼**M8**

(6) Käesoleva lisa peatükk B.68, „Lühiajalise kokkupuute *in vitro* katsemeetod selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, i) mis tekitavad raskeid silmakahjustusi, ja ii) mida ei ole vaja klassifitseerida seoses silmade ärrituse või raske silmakahjustusega“.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010), „Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing“, *ALTEX*, nr 27, eriväljaanne 2010, lk 261–266.

(8) EC EURL ECVAM (2014), „The EURL ECVAM – Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report.“ EUR 28 125 EN; doi:10.2787/41680. Kättesaadav aadressil http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (2014), „ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan.“ ESACi arvamus nr 2014-03, 17. november 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. Kättesaadav aadressil http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016), „Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals“, *Toxicol. In Vitro*, nr 31, lk 43–53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016), „Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing“, *Toxicol. In Vitro*, nr 34, lk 55–70.

(12) EURL ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (2016), „ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT)“, ESACi arvamus nr 2016-02, 24. juuni 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. Kättesaadav aadressil http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016), „Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS“ (pooleliolev käsikiri).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944), „Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes“, *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics*, nr 82, lk 377–390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010), „A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches“, *Toxicol. In Vitro*, nr 24, lk 1–9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983), „Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays“, *J. Immunol. Methods*, nr 65, lk 55–63.

(17) OECD (2016), „Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492“, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(18) OECD (2005), „Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011), „Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation“, *Altern. Lab. Anim.*, nr 39, lk 339–364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003), „Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology“, Väljaandes: Salem, H., Katz, S.A. (toim.), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, lk 147–159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013), „Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation“, *Toxicol. In Vitro*, nr 27, lk 619–626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013), „Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation“, *Toxicol. In Vitro*, nr 27, lk 1 476–1 488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015), „The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications“, *Altern. Lab. Anim.*, nr 43, lk 1–18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014), „Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods“, *Arch. Toxicol.*, nr 88, lk 701–723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017), „Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD)“, *Arch. Toxicol.*, nr 91, lk 521–547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011), „Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium“, *Molecular Vision*, nr 17, lk 113–126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991), „Eye Irritation“, väljaandes *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. ja Maibach H.I. (toim.), 4th trükk, lk 749–815, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, DC, USA.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008), „Toxic Responses of the Ocular and Visual System,“ Väljaandes „Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons“, Klaassen C.D. (toim.), 7. trükk, lk 665–697, McGraw-Hill Ryerson, Withby, ON, Kanada.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998), „Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death“, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, nr 39, lk 922–936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002), „Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays“, *Reg. Tox. Pharmacol.*, nr 36, lk 106–117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001), „Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests“, *Toxicol. In Vitro*, nr 15, lk 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998), „Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses“, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, nr 39, lk 2 610–2 625.

(33) Jester, J.V. (2006), „Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test“, *Cutan. Ocul. Toxicol.*, nr 25, lk 41–54.

(34) EpiOcular™i silmaärrituse katse standardeeskiri, 8. versioon (5. märts 2013), „EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals“, kättesaadav aadressil https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(35) SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katse standardeeskiri, 1. versioon (20. juuli 2015), „SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals“, kättesaadav aadressil https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015), „Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals“, *Toxicol. In Vitro*, nr 29, lk 741–761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015), „EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times“, *Altern. Lab. Anim.*, nr 43, lk 101–127.

(38) USA Toidu- ja Ravimiamet (2001), „Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation“, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, mai 2001. Kättesaadav aadressil http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017), „Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263“, ENV Publications, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼M8

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodiga saadud tulemuste ja nõuetekohaste võrdlusväärtuste kokkulangevuse määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks olulistest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (18).

Võrdluskemikaal: kemikaal, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava kemikaaliga. Võrdluskemikaalil peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija, kes kemikaali identifitseerib ja seda kirjeldab; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava(te) kemikaali(de)ga ja/või sellega/nendega sarnane kemikaali-/tooteklass; iii) teadaolevad füüsikalis-keemilised omadused; iv) teadaolevat toimet tõendavad andmed ja v) teadaolev mõjusus soovitavas reaktsioonitugevuse vahemikus.

Alt-üles lähenemisviis: etapiviisiline lähenemisviis, mida kasutatakse niisuguste uuritavate kemikaalide korral, mille puhul on põhjust arvata, et need ei vaja klassifitseerimist ega märgistamist silmade ärrituse või raske silmakahjustusega seoses; nimetatud lähenemisviisi puhul eristatakse kõigepealt kemikaalid, mis ei vaja klassifitseerimist ega märgistamist (tulemus on negatiivne), muudest kemikaalidest (tulemus on positiivne).

Kemikaal: aine või segu.

Vastavus: vt „Täpsus“.

Sarvkest: silmamuna esikülje läbipaistev osa, mis katab vikerkesta ja pupilli ning laseb valgusel tungida silma sisse.

CV: variatsioonikordaja.

Dev: hälve.

EIT: silmaärrituse katse.

EURL ECVAM: loomkatsete alternatiivide Euroopa Liidu referentlabor.

Silmade ärritus: muutuse tekkimine silmas pärast uuritava kemikaali silma eespinnale manustamist, seejuures on muutus 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult taandunud. Samatähenduslik mõistetega „pöörduv mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 2. kategooria“.

ET_{50}: kokkupuuteaeg, mille jooksul pealekantud, teatava kindla kontsentratsiooniga võrdluskemikaal vähendab koe eluvõimelisust 50 % võrra.

Valenegatiivsete tulemuste määr: kõikide selliste ainete osakaal, mis peaksid andma positiivse tulemuse, kuid on katsemeetodit järgides andnud negatiivse tulemuse. See on üks katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja.

Valepositiivsete tulemuste määr: kõikide selliste ainete osakaal, mis peaksid andma negatiivse tulemuse, kuid on katsemeetodit järgides andnud positiivse tulemuse. See on üks katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja.

Oht: niisuguse mõjuri või olukorra loomupärane omadus, mis võib avaldada kahjulikku toimet, kui organism, süsteem või (ala)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

HCE: SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteel.

▼M8

HPLC: kõrgefektiivne vedelikkromatograafia.

IC_{50}: kontsentratsioon, mille juures võrdluskemikaal vähendab kindla kokkupuuteaja (nt 30-minutine töötlemine naatriumdodetsüülsulfaadiga) jooksul koe eluvõimelisust 50 % võrra.

Lõpmatu annus: RhCE-koemudelile kantud uuritava kemikaali kogus, mis on suurem epiteeli pinna täielikuks ja ühtlaseks katmiseks vajalikust kogusest.

Pöördumatu mõju silmale: vt „Raske silmakahjustus“.

LLOQ: alumine määramispiir.

LogP: oktanool-vesi jaotuskoefitsiendi logaritm.

Segu: kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Ühe koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles ühe peamise koostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Mitme koostisosaga aine: aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles rohkem kui ühe peamise koostisosa kontsentratsioon on ≥ 10 % ja < 80 % (massiprotsendid). Mitme koostisosaga aine saadakse tootmisprotsessi käigus. Erinevus segu ja mitme koostisosaga aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosaga aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

MTT: 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine.

Negatiivne kontrollproov: proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, mis teadaolevalt kutsub katsesüsteemis esile positiivse reaktsiooni. Seda proovi analüüsitakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovide ja teiste kontrollproovidega, et määrata kindlaks 100 % koe eluvõimelisus.

Klassifitseerimata: kemikaalid, mida ei ole klassifitseeritud seoses silmade ärrituse (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 2. kategooria, ÜRO GHSi kategooria 2A või 2B) ega raske silmakahjustusega (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane 1. kategooria). Samatähenduslik mõistega „ÜRO GHSi /CLP-määruse kohane kategooria puudub“.

NSC_{surnud}: mittespetsiifiline värvus surnud koes.

NSC_{elus}: mittespetsiifiline värvus elavas koes.

NSMTT: mittespetsiifiline MTT redutseerimine.

OD: optiline tihedus.

Toimivusnõuded: teaduslikult põhjendatuks arvatud valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kuivõrd saab kavandatud katsemeetodit võrrelda teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadse meetodiga. Hõlmab järgmist: i) katsemeetodi olulised osad; ii) valideeritud katsemeetodi nõuetekohase toimivuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloend ja iii) võrreldavad täpsuse ja usaldusväärsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (18).

▼**M8**

Positiivne kontrollproov: proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, mis teadaolevalt kutsub katsesüsteemis esile positiivse reaktsiooni. Seda proovi analüüsitakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovide ja teiste kontrollproovidega. Selleks, et oleks võimalik hinnata positiivse kontrollproovi esilekutsutud reaktsiooni varieeruvust ajas, ei tohi positiivne reaktsioon olla ülemäära tugev.

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat mõju, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist mõju. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi täpsuse (vastavuse) aspekti (18).

Usaldusväärsus: iseloomustab katsemeetodi korratavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline korratavus ning laborisisene korduvus (18).

Asendav meetod: katsemeetod, mis on kavandatud rutiinses kasutuses oleva kinnitatud meetodi asendamiseks ohtude kindlakstegemise ja/või riskide hindamise meetodina ning mille puhul on kindlaks tehtud, et see tagab kas inimeste või loomade tervise või keskkonna samaväärse või parema kaitse kui kinnitatud katsemeetod kõikide võimalike määramisolukordade ja kemikaalide puhul (18).

Korratavus: sama uuritava kemikaali ja sama katsemetoodikaga korduvatel katsetel saadud tulemuste kokkulangevus (18).

Pöörduv mõju silmale: vt „Silmade ärritus“.

RhCE: rekonstrueeritud inimese sarvkesta sarnane epiteel.

Analüüsitsükkel: analüüsitsükkel hõlmab ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsi koos negatiivse ja positiivse kontrollprooviga.

SD: standardhälve.

Tundlikkus: kõigi niisuguste positiivsete/reaktsioonivõimeliste uuritavate kemikaalide osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (18).

▼M8

Raske silmakahjustus: sellise koekahjustuse tekkimine silmas või selline tugev nägemisteravuse langus pärast seda, kui uuritavat ainet on manustatud silma eespinnale, mis ei ole 21 päeva jooksul pärast manustamist täielikult pöörduv. Samatähenduslik mõistetega „pöördumatu mõju silmale“ ja „ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane 1. kategooria“.

Standardeeskiri: kirjalik formaalne eeskiri, mis kirjeldab üksikasjalikult, kuidas viia läbi rutiinseid ja katsega seotud laboritoiminguid. See on nõutav hea laboritava kohaselt.

Spetsiifilisus: kõigi niisuguste negatiivsete/mittereageerivate uuritavate kemikaalide osakaal, mis katse tulemusel klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (18).

Aine: looduslik või tootmisprotsessi teel saadud keemiline element ja selle ühendid, kaasa arvatud stabiilsuse säilitamiseks vajalikud lisaained ja tootmisprotsessist tingitud lisandid, välja arvatud mis tahes lahusti, mida on võimalik aine stabiilsust vähendamata ja selle koostist muutmata eraldada.

Katse: ühe uuritava kemikaali analüüsimine vähemalt kahe paralleelse koeprooviga, nagu määratletud vastavas standardeeskirjas.

Koe eluvõimelisus: rekonstrueeritud koe rakupopulatsiooni üldist aktiivsust (nt rakkude võimet redutseerida vitaalvärvainet MTT) väljendav parameeter, mis olenevalt mõõdetavast näitajast ja katseplaanist on vastavuses elusrakkude koguarvu ja/või elujõulisusega.

Ülalt-alla lähenemisviis: etapiviisiline lähenemisviis, mida kasutatakse niisuguste kemikaalide korral, mille puhul on põhjust arvata, et need põhjustavad rasket silmakahjustust; nimetatud lähenemisviisi puhul eristatakse kõigepealt rasket silmakahjustust tekitavad kemikaalid (tulemus on positiivne) muudest kemikaalidest (tulemus on negatiivne).

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Astmelise katsetamise strateegia: Etapiviisi katsete tegemise strateegia, milles kasutatakse järjestikku eri katsemeetodeid. Enne strateegia järgmise etapiga alustamist vaadatakse igas etapis läbi kogu uuritava kemikaali kohta olemasolev teave, kasutades tõendite kaalukuse menetlust, et otsustada, kas teave on ohuklassi määramiseks piisav. Kui olemasoleva teabe põhjal saab antud etapis otsustada uuritava kemikaali võimaliku ohtlikkuse üle, ei ole täiendavaid katseid vaja teha (18).

ULOQ: ülemine määramispiir.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS (Globally Harmonized System)): süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (1).

ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane 1. kategooria: vt „Raske silmakahjustus“.

ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohane 2. kategooria: vt „Silmade ärritus“.

ÜRO GHSi ja CLP-määruse kohase kategooriata: kemikaalid, mis ei vasta ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. ega 2. kategooriasse (ega ÜRO GHSi 2A või 2B kategooriasse) klassifitseerimise nõuetele. Samatähenduslik mõistega „Klassifitseerimata“.

UPLC: ultraefektiivne vedelikkromatograafia.

▼M8

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Teaduslikult põhjendatud katsemeetod: katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul käsitatakse piisavana ning mis põhineb teaduslikult tõendatud põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi teaduslikult põhjendatud absoluutses tähenduses, vaid ainult seoses määratud eesmärgiga (18).

Valideeritud katsemeetod: katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul (18).

VRM: valideeritud võrdlusmeetod.

VRM1: EpiOcular™i silmaärrituse katsele viidatakse kui 1. valideeritud võrdlusmeetodile.

VRM2: SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutava silmaärrituse katsele viidatakse kui 2. valideeritud võrdlusmeetodile.

Tõendusmaterjali kaalukuse hindamine: protsess, milles kaalutakse mitmesuguste andmete tugevaid ja nõrku külgi, et jõuda otsuseni uuritava aine võimaliku ohtlikkuse kohta ja toetada sellist otsust.

▼M8

2. liide

KATSEMEETODI PEAMISED OSAD – RHCE-KOEMUDELIT KASUTAV KATSEMEETOD, MIS ON VALIDEERITUD NENDE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA EGA MÄRGISTADA SEOSES SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Metoodikad	Vedelikud (pipeteeritavad 37 ± 1 °C juures või madalamal temperatuuril 15 minuti jooksul)	Tahked ained (mittepipeteeritavad)	Vedelikud ja viskoossed ained (pipeteeritavad)	Tahked ained (mittepipeteeritavad)
Mudeli pindala	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Paralleelsete koeproovide arv	Vähemalt 2	Vähemalt 2	Vähemalt 2	Vähemalt 2
Segava värvuse eelkontroll	50 µl + 1 ml H_2O 60 minuti jooksul temperatuuril 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % (värvuseta uuritavad kemikaalid) või 50 µl + 2 ml isopropanooli, segada toatemperatuuril 2–3 tundi (värvilised uuritavad kemikaalid) → kui uuritava kemikaali optiline tihedus lainepikkusel 570 ± 20 nm pärast isopropanooli või vee optilise tiheduse lahutamist on > 0,08 (mis on ligikaudu 5 % negatiivse kontrollproovi keskmisest optilisest tihedusest), tuleks teha kohandatud kontrollkatsed eluskoega.	50 mg + 1 ml H_2O 60 minuti jooksul temperatuuril 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % (värvuseta uuritavad kemikaalid) või 50 mg + 2 ml isopropanooli, segada toatemperatuuril 2–3 tundi (värvilised ja värvuseta uuritavad kemikaalid) → kui uuritava kemikaali optiline tihedus lainepikkusel 570 ± 20 nm pärast isopropanooli või vee optilise tiheduse lahutamist on > 0,08 (mis on ligikaudu 5 % negatiivse kontrollproovi keskmisest optilisest tihedusest), tuleks teha kohandatud kontrollkatsed eluskoega.	10 µl + 90 µl H_2O, segada 30 ± 2 minutit toatemperatuuril (18–28°C) → kui uuritav kemikaal on värviline, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed eluskoega.	10 mg + 90 µl H_2O, segada 30 ± 2 minutit toatemperatuuril → kui uuritav kemikaal on värviline, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed eluskoega.

▼M8

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
MTT otsese redutseerimise eelkontroll	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml lahust, 180 ± 15 min 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % → kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed külmutades saadud surnud kudedega (negatiivse kontrollainena kasutatakse 50 µl steriilset deioniseeritud vett MTT lahuses)	50 µg + 1 ml MTT 1 mg/ml lahust, 180 ± 15 min 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % → kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed külmutades saadud surnud kudedega (negatiivse kontrollainena kasutatakse 50 µl steriilset deioniseeritud vett MTT lahuses)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml lahust, 180 ± 15 min 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % → kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed vees saadud surnud kudedega (negatiivse kontrollainena kasutatakse 30 µl steriilset deioniseeritud vett MTT lahuses)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml lahust, 180 ± 15 min 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 % → kui lahus muutub siniseks/lillaks, tuleks teha kohandatud kontrollkatsed vees saadud surnud kudedega (negatiivse kontrollainena kasutatakse 30 µl steriilset deioniseeritud vett MTT lahuses)
Eeltöötlus	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBS, 30 ± 2 min 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %, valguse eest kaitstud.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBS, 30 ± 2 min 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %, valguse eest kaitstud.	–	–
Töötlemiskogused ja pealekandmine	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) kalibreeritud vahendiga (nt tasandatud lusikatäis lusikaga, mis on kalibreeritud 50 g naatriumkloriidi mõõtmiseks).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBS, + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Viskoossete vedelike korral kasutada nailonvõrku	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBS, + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Kokkupuuteaeg ja -temperatuur	30 min (± 2 min) söötmes 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	6 tundi (± 0,25 tundi) söötmes 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	30 min (± 2 min) söötmes 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	4 tundi (± 0,1 tundi) söötmes 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %
Loputamine toatemperatuuril	3 korda 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBSiga	3 korda 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBSiga	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBSiga	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBSiga
Kokkupuutejärgne sukeldamine	12 min (± 2 min) toetemperatuuril söötmes	25 min (± 2 min) toetemperatuuril söötmes	30 min (± 2 min) 37°C juures, 5 % CO_2, suhteline õhuniiskus 95 %, söötmes	30 min (± 2 min) toatemperatuuril söötmes

▼M8

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Kokkupuutejärgne inkubeerimine	120 min (± 15 min) söötmes 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	18 tundi (± 0,25 tundi) söötmes 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	puudub	18 tundi (± 0,5 tundi) söötmes 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %
Negatiivne kontrollproov	50 µl H_2O Analüüsitakse paralleelselt	50 µl H_2O Analüüsitakse paralleelselt	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBSi Analüüsitakse paralleelselt	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vaba DPBSi Analüüsitakse paralleelselt
Positiivne kontrollproov	50 µl metüülatsetaati Analüüsitakse paralleelselt	50 µl metüülatsetaati Analüüsitakse paralleelselt	30 ± 2µl metüülatsetaati Analüüsitakse paralleelselt	30 ± 2µl metüülatsetaati Analüüsitakse paralleelselt
MTT lahus	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml	300 µl, 1 mg/ml
MTT inkubeerimisaeg ja -temperatuur	180 min (± 15 min) 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	180 min (± 15 min) 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	180 min (± 15 min) 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %	180 min (± 15 min) 37 ± 2°C juures, 5 ± 1 % CO_2, suhteline õhuniiskus ≥ 95 %
Ekstraheerimislahusti	2 ml isopropanooli (ekstraheerimine plaadi pealt ja alt, kude läbi torgates)	2 ml isopropanooli (ekstraheerimine plaadi alt, kude läbi torgates)	1,5 ml isopropanooli (ekstraheerimine plaadi pealt ja alt)	1,5 ml isopropanooli (ekstraheerimine plaadi alt)
Ekstraheerimisaeg ja -temperatuur	2–3 tundi loksutades (~120 pööret minutis) toatemperatuuril või üle öö temperatuuril 4–10 °C	2–3 tundi loksutades (~120 pööret minutis) toatemperatuuril või üle öö temperatuuril 4–10 °C	4 tundi loksutades (~120 pööret minutis) toatemperatuuril või vähemalt üle öö ilma loksutamata temperatuuril 4–10 °C	Vähemalt 2 tundi loksutades (~120 pööret minutis) toatemperatuuril
Optilise tiheduse mõõtmine	570 nm (550–590 nm) ilma võrdlusfiltrita	570 nm (550–590 nm) ilma võrdlusfiltrita	570 nm (540–600 nm) ilma võrdlusfiltrita	570 nm (540–600 nm) ilma võrdlusfiltrita
Koe kvaliteedi kontroll	Töötlemine 100 µl 0,3-mahuprotsendilise Triton X-100-ga 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Töötlemine 100 µl 0,3-mahuprotsendilise Triton X-100-ga 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30-minutine töötlemine naatriumdodetsüülsulfaadiga (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30-minutine töötlemine naatriumdodetsüülsulfaadiga (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

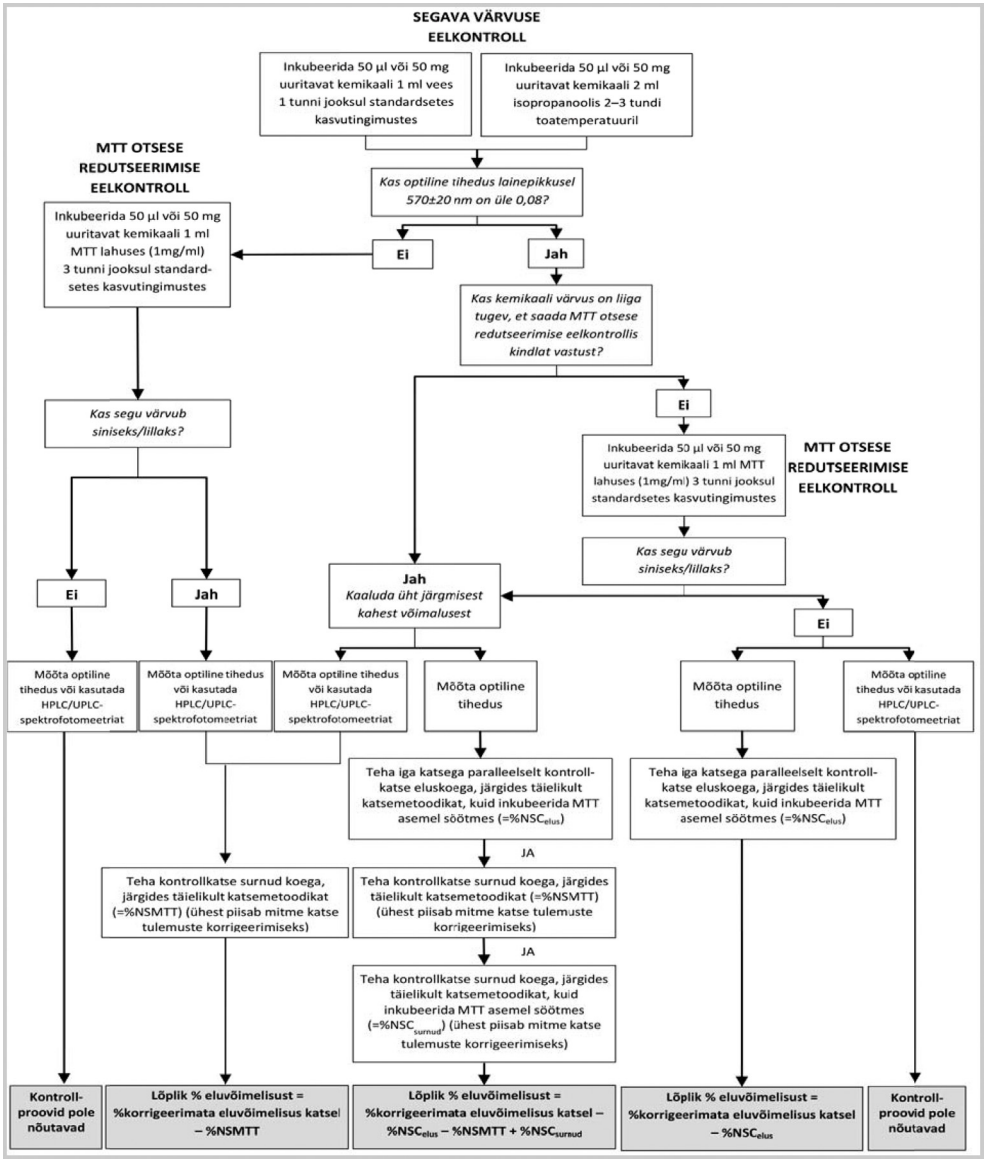
▼M8

Katse osad	EpiOcular™i silmaärrituse katse (VRM 1)		SkinEthic™i inimese sarvkesta epiteeli kasutav silmaärrituse katse (VRM 2)	
Nõuetekohasuse kriteeriumid	1. Negatiivse kontrollainega töödeldud paralleelsete koeproovide keskmine optiline tihedus peab olema > 0,8 ja < 2,5 2. 30 minutit positiivse kontrollainega kokku puutunud paralleelsete koeproovide keskmine eluvõimelisus, väljendatuna protsendina negatiivse kontrollainega saadud tulemusest, peab olema < 50 % 3. Kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus ei tohi ületada 20 %	1. Negatiivse kontrollainega töödeldud paralleelsete koeproovide keskmine optiline tihedus peab olema > 0,8 ja < 2,5 2. 6 tundi positiivse kontrollainega kokku puutunud paralleelsete koeproovide keskmine eluvõimelisus, väljendatuna protsendina negatiivse kontrollainega saadud tulemusest, peab olema < 50 % 3. Kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus ei tohi ületada 20 %	1. Negatiivse kontrollainega töödeldud paralleelsete koeproovide keskmine optiline tihedus peab olema > 1,0 ja ≤ 2,5 2. 30 minutit positiivse kontrollainega kokku puutunud paralleelsete koeproovide keskmine eluvõimelisus, väljendatuna protsendina negatiivse kontrollainega saadud tulemusest, peab olema ≤ 30 % 3. Kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus ei tohi ületada 20 %	1. Negatiivse kontrollainega töödeldud paralleelsete koeproovide keskmine optiline tihedus peab olema > 1,0 ja ≤ 2,5 2. 4 tundi positiivse kontrollainega kokku puutunud paralleelsete koeproovide keskmine eluvõimelisus, väljendatuna protsendina negatiivse kontrollainega saadud tulemusest, peab olema ≤ 20 % 3. Kahe paralleelse koeproovi eluvõimelisuse erinevus ei tohi ületada 20 %

▼**M8**

3. liide

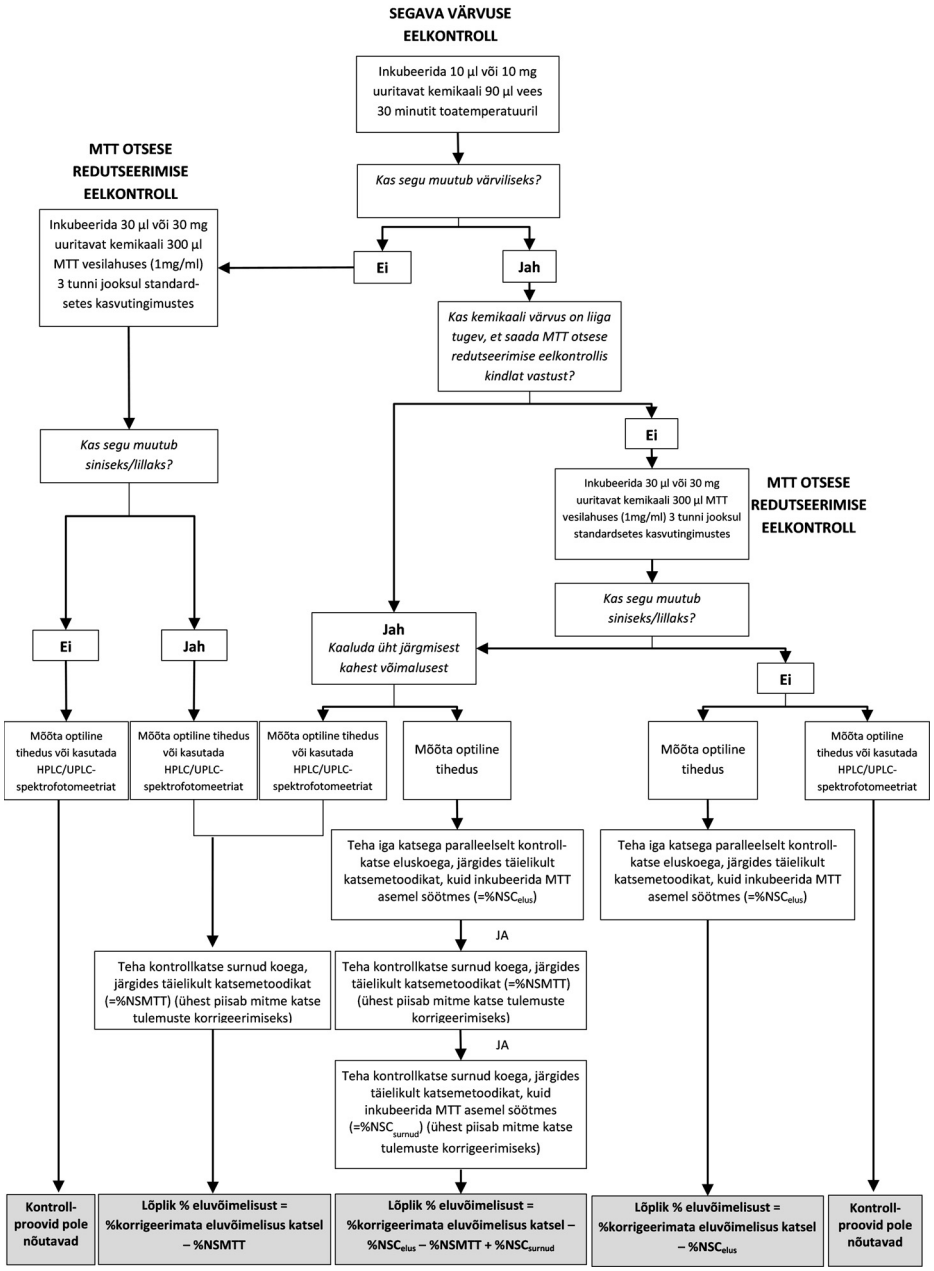
VRM1 STANDARDEESKIRJAL PÕHINEV ILLUSTREERIV VOOSKEEM, MILLEST JUHINDUDA MTT OTSESTE REDITSEERIJATE JA/VÕI SEGAVA VÄRVUSEGA KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEL JA NENDEGA TEGELEMISEL



▼**M8**

4. liide

VRM2 STANDARDEESKIRJAL PÕHINEV ILLUSTREERIV VOOSKEEM, MILLEST JUHINDUDA MTT OTSESTE REDITSEERIJATE JA/VÕI SEGAVA VÄRVUSEGA KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEL JA NENDEGA TEGELEMISEL



▼**M8**

5. liide

HPLC-/UPLC-SPEKTROMEETRIA APARATUURI PEAMISED KVALIFIKATSIOONINÄITAJAD JA NENDE NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID SEOSES RHCE-KOEMUDELIST EKSTRAHEERITUD MTT FORMASAANI MÕÕTMISEGA

Näitaja	USA Toidu- ja Ravimiameti juhendist (36, 38) tuletatud eeskiri	Nõuetekohasuse kriteeriumid
Selektiivsus	Isopropanooliga ekstraheeritud eluskoe tühiproovi (töötlemata elusa RhCE-koemudeli ekstrakt isopropanooliga), surnud koe tühiproovi (töötlemata surnud RhCE-koemudeli ekstrakt isopropanooliga) ja värvaine (nt metüleensinine) analüüs	$Pindala_{segav} \leq 20\ \%\ pindalast_{LLOQ}$ (1)
Kordustäpsus	Kvaliteedi kontrollimise katsed (st MTT formasaan kontsentratsiooniga 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanooliga (n = 5)	CV ≤ 15 % või alumise määramispiiri korral ≤ 20 %
Täpsus	Kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n = 5)	%Dev ≤ 15 % või alumise määramispiiri korral ≤ 20 %
Maatriksefekt	Kvaliteedi kontrollimise katsed elusa koega tühiprooviga (n = 5)	85 % ≤ %maatriksefekt ≤ 115 %
Proovimälu	Isopropanooli analüüs pärast ULOQ (2) standardit	$Pindala_{segav} \leq 20\ \%\ pindalast_{LLOQ}$
Korratavus (samal päeval)	3 sõltumatut kaliibrimisgraafikut (MTT formasaani lahus isopropanoolis, 6 järjestikust lahjendust 1/3 võrra alates ülemisest määramispiirist, st 200 µg/ml) Kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n = 5)	Kaliibrimiskõverad: %Dev ≤ 15 % või alumise määramispiiri korral ≤ 20 % Kvaliteedi kontrollimise katsed: %Dev ≤ 15 % ja CV ≤ 15 %
Korratavus (eri päevadel)	1. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n=3) 2. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n=3) 3. päev: 1 kaliibrimiskõver ja kvaliteedi kontrollimise katsed isopropanooliga (n=3)	
MTT formasaani lühiajaline stabiilsus RhCE-koe ekstraktis	Kvaliteedi kontrollimise katsed elusa koega tühiproovidega (n = 3), analüüsitud valmistamise päeval ja pärast 24 tundi toatemperatuuril seismist	%Dev ≤ 15 %
MTT formasaani pikaajaline stabiilsus RhCE-koe ekstraktis, kui see on nõutav	Kvaliteedi kontrollimise katsed elusa koega tühiproovidega (n = 3), analüüsitud valmistamise päeval ja pärast mitu päeva –20 °C juures seismist	%Dev ≤ 15 %

(1) LLOQ: alumine määramispiir, peab olema 1–2 % koe eluvõimelisusest, st 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: ülemine määramispiir, peab olema vähemalt kaks korda suurem MTT formasaani suurimast eeldatavast kontsentratsioonist isopropanooliga negatiivsetest kontrollproovidest saadud ekstraktides (valideeritud võrdlusmeetodis ~70 µg/ml), st 200 µg/ml.

▼M8

B.70. **REKOMBINANTSEL INIMESE ÖSTROGEENIRETSEPTORIL (hrER) PÕHINEVAD *IN VITRO* ANALÜÜSIMEETODID ÖSTROGEENIRETSEPTORIGA SEONDUVATE KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS**

ÜLDINE SISSEJUHATUS

Tulemusnäitajatel põhinev Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsiooni (OECD) katsejuhend

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 493 (2015). Katsejuhend nr 493 on tulemusnäitajatel põhinev katsejuhend, milles kirjeldatakse *in vitro* analüüsimeetodeid inimese rekombinantse östrogeeniretseptoriga (ER) seonduvate ainete tuvastamiseks (hrERiga seondumise katsed). See hõlmab kahte vaadeldava mehhanismi ja funktsionaalsuse poolest sarnast analüüsimeetodit östrogeeniretseptoriga (st α-ERiga) seonduvate kemikaalide tuvastamiseks ja peaks hõlbustama uute sarnaste või modifitseeritud analüüsimeetodite väljatöötamist vastavalt valideerimispõhimõtetele, mis on esitatud ohuhindamiseks kasutatavate uute või ajakohastatud katsemeetodite valideerimist ja rahvusvahelist tunnustamist käsitlevas OECD juhenddokumendis (1). Kõnealuse tulemusnäitajatel põhineva katsejuhendi aluseks on järgmised täielikult valideeritud võrdlusmeetodid (2. ja 3. liide):

— täispikal rekombinantsel inimese α-ERil põhinev Freybergeri-Wilsoni (FW) *in vitro* meetod östrogeeniretseptoriga seondumise analüüsimiseks (2) ja

— ligandiga seonduval rekombinantsel inimese valgudomeenil põhinev Jaapani Kemikaalide Hindamise ja Uurimise Instituudi (CERI) *in vitro* meetod östrogeeniretseptoriga seondumise analüüsimiseks (2).

On kehtestatud tulemuslikkuse standardid (3), mis hõlbustavad sama ohunäitaja hindamiseks kasutatavate sarnaste katsemeetodite väljatöötamist ja valideerimist ning võimaldavad tulemusnäitajatel põhinevat katsejuhendit nr 493 õigeaegselt muuta, et täiendada seda ajakohastamise eesmärgil uute sarnaste analüüsimeetoditega. Siiski lisatakse sarnased katsemeetodid juhendisse üksnes pärast seda, kui OECD on need läbi vaadanud ja kinnitanud nende vastavust tulemuslikkuse standarditele. Östrogeeniretseptoriga seondumise katsete tulemusi käsitlevatele OECD liikmesriikide nõuetele vastavuse saavutamiseks võib kasutada ükskõik millist katsejuhendis nr 493 esitatud analüüsimeetodit ning seejuures saadakse kasu OECD otsuse kohasest andmete vastastikusest tunnustamisest.

Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud analüüsimeetodite taust ja põhimõtted

2. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et võimaldada sõeluuringute tegemist võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide tuvastamiseks ja selliste kemikaalide hindamist. OECD kontseptuaalset raamistikku võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide analüüsimiseks ja hindamiseks muudeti 2012. aastal. Nii algne kui ka muudetud kontseptuaalne raamistik on esitatud kemikaalide võimaliku endokriinfunktsiooni kahjustava toime hindamise standardiseeritud katsejuhendeid käsitleva juhenddokumendi lisadena (4). Kõnealune kontseptuaalne raamistik hõlmab viit taset; iga tase vastab bioloogilise keerukuse eri tasemele. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud ERiga seondumise katsed kuuluvad 2. tasemele, mis hõlmab „*in vitro* katseid valitud endokriinse(te) mehhanismi(de) või raja/radade kohta andmete saamiseks“. Käesolev katsemeetod on ette nähtud retseptoriga seondumise *in vitro* katsete tegemiseks eesmärgiga tuvastada inimese östrogeeniretseptori α-vormi (α-ER) ligandid.

▼M8

3. ERiga tehtavate i*n vitro* seondumiskatsete asjakohasus bioloogiliste funktsioonide hindamisel on selgelt tõendatud. ERiga tehtavad seondumiskatsed on ette nähtud selliste kemikaalide tuvastamiseks, millel võib olla kahjulik mõju östrogeenirajale, ning neid on viimase kahe kümnendi jooksul laialdaselt kasutatud, et iseloomustada ERi jaotust kudedes ja identifitseerida ERi agoniste/antagoniste. Need katsed põhinevad ligandi ja retseptori vahelisel interaktsioonil, mis on esimene samm östrogeeni signaalirajas ja on hädavajalik kõigi selgroogsete paljunemisvõime tagamiseks.

4. Östrogeenide interaktsioon ERidega võib mõjutada östrogeeni kontrollitavate geenide transkriptsiooni ja avaldada mittegenoomset mõju, mille tulemusena võidakse käivitada või pärssida muu hulgas selliseid rakuprotsesse, mis on vajalikud rakkude paljunemiseks, loote normaalseks arenguks ja paljunemisvõime säilitamiseks (5, 6, 7). Normaalsete östrogeensete süsteemide häiretel võib olla kahjulik mõju normaalsele arengule (ontogenees), reproduktiivtervisele ja reproduktiivsüsteemi terviklikkusele. Ebasobiv ERist lähtuv signaaliülekanne võib näiteks suurendada hormoonsõltuva vähi tekke riski, vähendada viljakust ja põhjustada muutusi loote kasvus ja arengus (8).

5. *In vitro* seondumiskatsed põhinevad aine otsesel interaktsioonil retseptori spetsiifilise ligandiseondumiskohaga, mille kaudu reguleeritakse geenitranskriptsiooni. Inimese rekombinantse α-östrogeeniretseptoriga (hr-α-ER) seondumise katses mõõdetakse põhinäitajana radiomärgistatud ligandi ([^{3}H]17β-östradiool) võimet seonduda ERiga üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali (st konkureeriva ligandi) juuresolekul. Uuritavad kemikaalid, millel on ERi suhtes suur afiinsus, konkureerivad radiomärgistatud ligandiga väiksemal kontsentratsioonil kui kemikaalid, mille afiinsus retseptori suhtes on väiksem. Kõnealune meetod hõlmab kahte põhielementi: küllastava seondumise katset, millega iseloomustatakse retseptori ja ligandi vahelise interaktsiooni parameetreid ja dokumenteeritakse spetsiifilisus ERi suhtes, ning sellele järgnevat konkureeriva seondumise katset, millega iseloomustatakse uuritava kemikaali ja radiomärgistatud ligandi vahelist konkurentsi ERile seondumisel.

6. CERI ja FW seondumiskatsete asjakohasus ja usaldusväärsus sihtotstarbelisel kasutamisel on valideerimisuuringutega tõendatud (2).

7. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

Retseptoriga seondumise katsete rakendusala ja piirangud

8. Kõnealused katsed on ette nähtud sõeluuringu tegemiseks ja prioriseerimiseks, kuid nende käigus võib ühtlasi saada teavet molekulaarse lähtesündmuse kohta, mida saab kasutada tõendite kaalukusel põhineva lähenemisviisi puhul. Katsetes vaadeldakse kemikaali seondumist α-ERi ligandi siduvale domeenile *in vitro* süsteemis. Seega tuleks hoiduda saadud tulemuste otsesest ekstrapoleerimisest tervikliku endokriinsüsteemi keerukale signaaliülekande- ja reguleerimismehhanismile *in vivo*.

▼**M8**

9. Loodusliku ligandi 17β-östradiooli seondumine on esimene samm selliste molekulaarsete sündmuste jadas, mille abil aktiveeritakse sihtgeenide transkriptsioon ja mille lõpptulemuseks on füsioloogiline muutus (9). Seega on seondumine α-ERi ligandi siduvale domeenile üks peamisi ERi vahendatavate endokriinsüsteemi häirete tekkemehhanisme, kuigi kõnealuseid häireid võivad põhjustada ka muud mehhanismid, sealhulgas i) interaktsioon α-ERi teiste piirkondadega peale ligandisidumistasku, ii) interaktsioon östrogeeni signaalirajaga seotud muude retseptoritega, α-ERiga ja G-valguga seotud östrogeeniretseptoriga ning teiste endokriinsüsteemi retseptorite ja ensüümisüsteemidega, iii) hormoonide süntees, iv) hormoonide metaboolne aktiveerimine ja/või inaktiveerimine, v) hormoonide jaotumine sihtkudedes ja vi) hormoonide väljutamine kehast. Selliseid toimemehhanisme ei vaadelda üheski käesoleva katsemeetodi kohases katses.

10. Käesoleva katsemeetodi puhul uuritakse ainete võimet seonduda inimese α-ERiga ja see ei võimalda eristada α-ERi agoniste α-ERi antagonistidest. Kõnealustes katsetes ei vaadelda ka seondumisele järgnevaid sündmusi, näiteks geenitranskriptsiooni ega füsioloogilisi muutusi. Kuna valideerimisel kasutati ühekaupa aineid, mis koosnevad ainult ühest koostisosast, ei ole uuritud selle meetodi kohaldatavust segude analüüsimiseks. Teoreetiliselt on kõnealustes katsetes siiski võimalik analüüsida ka mitut koostisosa sisaldavaid aineid ja segusid. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

11. Rakuvabadel retseptorisüsteemidel puudub metaboliseerimisvõime ja neid ei ole valideeritud kombinatsioonis metaboolsete ensüümisüsteemidega. Siiski võib olla võimalik lisada uuringumudelisse metaboliseerimisvõimet tagavad elemendid, kuid see nõuab täiendavat valideerimist.

12. Kemikaale, mis võivad valku (st retseptorvalku) denatureerida – näiteks pindaktiivseid aineid ja analüüsipuhvri pH-d muuta võivaid kemikaale –, ei tohi analüüsida või võib analüüsida üksnes kontsentratsioonidel, mille juures selline mõju puudub. Muudel juhtudel võib uuritava kemikaali analüüsimiseks kasutada kontsentratsioonivahemikku, mille puhul kemikaal on analüüsipuhvris lahustuv.

13. Tabelis 1 on teavitamise eesmärgil esitatud katsetulemused 24 aine kohta, mida on analüüsitud mõlema käesolevas katsemeetodis kirjeldatud täielikult valideeritud analüüsimeetodiga. Avaldatud aruannete kohaselt, mis muu hulgas hõlmavad *in vitro* katseid ERi-seoselise transkriptsiooni aktiveerimise tuvastamiseks ja uterotroofse mõju analüüsi, liigitati nendest ainetest 17 ERiga seonduvateks aineteks ja kuus mitteseonduvateks aineteks (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Vastavalt tabelis 1 esitatud kokkuvõtlikele andmetele on kahe analüüsimeetodiga saadud liigitamistulemused kõigi ainete puhul kuni kontsentratsioonini 10^{-4} M peaaegu täielikult kattuvad ja iga aine on õigesti liigitatud ERiga seonduvaks või ERiga mitteseonduvaks. Lisateave selle ainete rühma ja valideerimisuuringute raames tehtud ERiga seondumise katsetes analüüsitud täiendavate ainete kohta on esitatud hrERiga seondumise katsete tulemuslikkuse standardite (3) 2. lisas (tabelid 1, 2 ja 3).

▼M8

Tabel 1

Ainete liigitamine ERiga seonduvaks või mitteseonduvaks nende analüüsimisel FW ja CERI meetodite kohastes hrERiga seondumise katsetes ning võrdlus eeldatava tulemusega

	Aine nimetus	CASi nr	Eeldatav tulemus	FW meetod		CERI meetod		MeSHi kemikaaliklass	Tootekategooria
				Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus	Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus		
1	17β-östradiool	50-28-2	*Seonduv*	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Seonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
2	Noretünodreel	68-23-5	*Seonduv*	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
3	Noretindroon	68-22-4	*Seonduv*	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
4	Di-*n*-butüülftalaat	84-74-2	*Mitteseonduv* (*)	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv (**) (+)	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv (**) (+)	Süsivesinik (tsükliline), ester	Plastifikaator, keemiline vaheühend
5	DES	56-53-1	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (tsükliline), fenool	Ravim, veterinaarravim
6	17α-etünüülöstradiool	57-63-6	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
7	Mesoheksöstrool	84-16-2	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (tsükliline), fenool	Ravim, veterinaarravim
8	Genisteiin	446-72-0	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (heterotsükliline), flavonoid	Looduslik ühend

▼M8

	Aine nimetus	CASi nr	Eeldatav tulemus	FW meetod		CERI meetod		MeSHi kemikaaliklass	Tootekategooria
				Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus	Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus		
9	Ekvool	531-95-3	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Fütoöstrogeeni metaboliit	Looduslik ühend
10	Butüülparabeen (*n*-butüül-4-hüdroksübensoaat)	94-26-8	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Parabeen	Säilitusaine
11	Nonüülfenool (segu)	84852-15-3	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Alküülfenool	Vaheühend
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Kloororgaaniline ühend	Insektitsiid
13	Kortikosteroon	50-22-6	*Mitteseonduv* (*)	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	Steroid	Looduslik ühend
14	Zearalenoon	17924-92-4	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (heterotsükliline), laktoon	Looduslik ühend
15	Tamoksifeen	10540-29-1	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim, veterinaarravim
16	5α-dihüdrotestosteroon	521-18-6	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Steroid, mittefenoolne	Looduslik ühend
17	Bisfenool A	80-05-7	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Fenool	Keemiline vaheühend
18	4-*n*-heptüülfenool	1987-50-4	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Ebaselge [a]	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Alküülfenool	Vaheühend

▼M8

	Aine nimetus	CASi nr	Eeldatav tulemus	FW meetod		CERI meetod		MeSHi kemikaaliklass	Tootekategooria
				Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus	Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus		
19	Kepoon (kloordekoon)	143-50-0	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (halogeenitud)	Pestitsiid
20	Bens[*a*]antratseen	56-55-3	*Mitteseonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv ([b])	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv ([b])	Aromaatne süsivesinik	Vaheühend
21	Enterolaktoon	78473-71-9	*Seonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Fütoöstrogeen	Looduslik ühend
22	Progesteroon	57-83-0	*Mitteseonduv* (*)	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	Steroid	Looduslik ühend
23	Oktüültrietoksüsilaan	2943-75-1	*Mitteseonduv*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv	Silaan	Pinnamodifikaator
24	Atrasiin	1912-24-9	*Mitteseonduv* (*)	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	Heterotsükliline ühend	Herbitsiid

(*) Lahustuvuspiir $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) Di-*n*-butüülftalaadi (DBP) kasutamine ja klassifitseerimine mitteseonduva ainena põhineb analüüsimisel kuni kontsentratsioonini 10^{-4} M, sest valideerimiseelsete uuringute käigus täheldati mõnes laboris, et aine on kontsentratsioonil 10^{-3} M mittelahustuv (nt ilmneb hägusus).

([+]) Valideerimisuuringus analüüsiti di-*n*-butüülftalaati (DBP) kodeeritud katseainena kontsentratsioonidel kuni 10^{-3} M. Nendes tingimustes täheldati mõnes laboris radiomärgistatud ligandi seondumise vähenemist kõige suuremal kontsentratsioonil (10^{-3} M) ja/või lähenduskõvera ebasobivust. Neis katsetes liigitati DBP „ebaselgeks“ või „seonduvaks“ CERI meetodi puhul viiest laborist kolmes ja FW meetodi puhul kuuest laborist viies (vt allikas 2, jaotise IV.B.3 alajaotised a ja b ning jaotis VI.A).

([a]) Liigitus ei vasta eeldatavale tulemusele. 4-*n*-heptüülfenooli liigitamine „ebaselgeks“ või „mitteseonduvaks“ viiest laborist kolmes andis keskmiseks liigitamistulemuseks „ebaselge“. Täpsemal uurimisel ilmnes, et sellise liigitamise põhjuseks oli kemikaali piiratud lahustuvus, mis takistas täieliku seondumiskõvera saamist.

([b]) Valideerimisuuringu ajal liigitati bens[*a*]antratseen ümber mitteseonduvaks aineks (st negatiivne tulemus) lähtuvalt avaldatud kirjandusandmetest, mille alusel on tõendatud, et kõnealuse aine puhul täheldatav *in vitro* östrogeenne toime (16) põhineb peamiselt selle metaboolsel aktiveerimisel (17, 18). Kõnealuses laboritevahelises valideerimisuuringus kasutatud rakuvabades hrERiga seondumise katsetes aine ensümaatilist metaboolset aktiveerimist eeldatavalt ei toimu. Seega on see aine õige liigituse kohaselt „mitteseonduv“, kui seda kasutatakse FW ja CERI meetoditele vastavates katsetingimustes.

▼M8

hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID

Katse põhielemendid

14. Käesolevat katsemeetodit kohaldatakse katsete puhul, kus kasutatakse östrogeeniretseptorit ja sellega tugevalt seonduvat sobivat ligandi, mida on võimalik kasutada markeri/märgistusainena ja mida saab uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurendamise teel välja tõrjuda. Seondumiskatsed hõlmavad kahte järgmist põhielementi: 1) küllastav seondumine ja 2) konkureeriv seondumine. Küllastava seondumise katset kasutatakse retseptoripreparaadi spetsiifilisuse ja aktiivsuse kontrollimiseks, konkureeriva seondumise katset aga selleks, et hinnata uuritava kemikaali võimet seonduda hrERiga.

Kontrollid

15. Kavandatud paralleelsete kontrollide ja võrdlusöstrogeeni valikut tuleks põhjendada. Paralleelseid kontrolle (lahusti (kandeaine), positiivsed kontrollid (ERiga tugevalt seonduv aine ja nõrgalt seonduv aine), negatiivne kontroll (mitteseonduv aine)) kasutatakse vastavalt vajadusele meetodi töökindluse kontrollimiseks asjaomastes katsetingimustes ja nende alusel saab katseid omavahel võrrelda; need kuuluvad tavaliselt katse nõuetekohasuse kriteeriumide hulka (1). Igas analüüsitsüklis tuleks ühel plaadil kasutada võrdlusöstrogeeni ja kontrolle (st nõrgalt seonduv aine ja mitteseonduv aine) täieliku kontsentratsioonikõvera ulatuses. Kõik ülejäänud plaadid peaksid sisaldama: 1) nii E2 kui ka nõrgalt seonduvat ainet suures (umbes radiomärgistatud ligandi täielikuks väljatõrjumiseks vajalikus) ja keskmises (umbes IC_{50}-le vastavas) kontsentratsioonis kolmes paralleelis; 2) lahustiga kontrolli ja mittespetsiifilise seondumise kontrolli, kumbagi kolmes paralleelis.

Standardne kvaliteedikontrolli kord

16. Standardset kvaliteedikontrolli korda tuleks kohaldada vastavalt iga analüüsimeetodi kohta esitatud kirjeldusele, et tagada retseptorite aktiivsus, õigete kemikaalikontsentratsioonide kasutamine, hälbepiirides püsimine mitme korduskatse vältel ja ERiga seondumist käsitlevate ootuspäraste tulemuste saamise võimekus pikema aja vältel.

Labori pädevuse tõendamine

17. Enne tundmatute kemikaalide analüüsimist käesoleva katsemeetodi kohases katses tuleks igas laboris tõendada asjaomase meetodi kasutamise pädevust; selleks viiakse läbi küllastava seondumise katsed, et kontrollida ERi preparaadi spetsiifilisust ja aktiivsust, ning konkureeriva seondumise katsed võrdlusöstrogeeni ja kontrollidega (nõrgalt seonduv aine ja mitteseonduv aine). Laboris tuleks luua varasemate tulemuste andmebaas, mis sisaldab võrdlusöstrogeeni ja kontrollidega saadud tulemusi eri päevadel läbi viidud 3–5 sõltumatust katsest. Nende katsetega luuakse laboris varasemate võrdlusöstrogeeni ja kontrolle hõlmavate tulemuste näol võrdlusalus, mida kasutatakse järgnevate katsete nõuetekohasuse hindamise osana.

18. Katsesüsteemi reageerimisvõime kontrollimiseks analüüsitakse ka tabelis 2 loetletud pädevusaineid. Sellesse loetellu kantud pädevusained on valitud võrdlusainete hulgast, mida on kirjeldatud ERiga seondumise katsete tulemuslikkuse standardites (3). Kõnealused ained on turul kättesaadavad, kuuluvad kemikaaliklassidesse, mida tavaliselt seostatakse ERiga seondumise võimega, nende afiinsus ERi suhtes jääb sobivasse vahemikku (st tugevast kuni nõrgani) ja nende hulgas on ka mitteseonduvaid aineid (st negatiivsed kontrollid). Iga pädevusaine puhul kasutatavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama tabelis 2 esitatud vahemikku. Iga ainega tuleks läbi viia vähemalt kolm katset ning nende katsete tulemused peaksid vastama aine eeldatavale aktiivsusele. Iga katse tuleks läbi viia sõltumatult (st kasutada retseptori, kemikaalide ja reaktiivi värskelt valmistatud lahjendusi); seejuures tuleks iga kontsentratsiooni puhul kasutada kolme paralleelproovi. Pädevuse tõendamiseks tuleb iga pädevusaine liigitada õigesti positiivseks või negatiivseks. Pädevuse tõendamise katsed peaks läbi viima iga asjaomaseid analüüsimeetodeid omandav laborant.

▼M8

Tabel 2

hrERiga tehtavas konkureeriva seondumise katses kasutatavate kontrollide ja pädevusainete loetelu ([1])

Nr	Aine nimetus	CASi nr ([2])	Eeldatav tulemus ([3]) ([4])	Uuritav kontsentratsioonivahemik (M)	MeSHi kemikaaliklass ([5])	Tootekategooria ([6])
Kontrollid (võrdlusöstrogeen, nõrgalt seonduv aine, mitteseonduv aine)						
1	17β-östradiool	50-28-2	Seonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
2	Noretünodreel (või) Noretindroon	68-23-5 (või) 68-22-4	Seonduv	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
3	Oktüültrietoksüsilaan	2943-75-1	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Silaan	Pinnamodifikaator
Pädevusained ([6])						
4	Dietüülstilböstrool	56-53-1	Seonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Süsivesinik (tsükliline), fenool	Ravim, veterinaarravim
5	17α-etünüülöstradiool	57-63-6	Seonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
6	Mesoheksöstrool	84-16-2	Seonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Süsivesinik (tsükliline), fenool	Ravim, veterinaarravim
7	Tamoksifeen	10540-29-1	Seonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Süsivesinik (tsükliline)	Ravim, veterinaarravim
8	Genisteiin	446-72-0	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Heterotsükliline ühend, flavonoid	Looduslik ühend
9	Bisfenool A	80-05-7	Seonduv	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Fenool	Keemiline vaheühend
10	Zearalenoon	17924-92-4	Seonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	Heterotsükliline ühend, laktoon	Looduslik ühend

▼M8

Nr	Aine nimetus	CASi nr (2)	Eeldatav tulemus (3) (4)	Uuritav kontsentratsioonivahemik (M)	MeSHi kemikaaliklass (5)	Tootekategooria (6)
11	Butüülparabeen	94-26-8	Seonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$	Karboksüülhape, fenool	Säilitusaine
12	Atrasiin	1912-24-9	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Heterotsükliline ühend	Herbitsiid
13	Di-*n*-butüülftalaat (DBP) (7)	84-74-2	Mitteseonduv (8)	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Süsivesinik (tsükliline), ester	Plastifikaator, keemiline vaheühend
14	Kortikosteroon	50-22-6	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Looduslik ühend

(1) Kui pädevusaine ei ole enam turul kättesaadav, võib kasutada ainet, millel on ERiga seondumise võimet iseloomustav sama liigitus ja võrreldav toime tugevus ning mis kuulub samasse kemikaaliklassi.
(2) Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber.
(3) hrERiga seondumist käsitlevate CERI ja FW meetodite valideerimise uuringus α-ERiga seonduvaks või mitteseonduvaks aineks liigitamise tulemus (2).
(4) ERiga seondumise võimet hinnati lähtuvalt alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (ICCVAM) taustülevaatedokumentidest ERiga seondumise ja transkriptsiooni aktiveerimise katsete kohta (9) ning empiirilistest andmetest ja muust teabest, mis on avaldatud kirjanduse loetelus viidatud läbivaadatud uuringutulemustena (10, 11, 12, 13, 14, 15).
(5) Ainete liigitamiseks ühte või mitmesse kemikaaliklassi kasutati rahvusvaheliselt tunnustatud standardiseeritud klassifitseerimissüsteemina USA riikliku meditsiiniraamatukogu meditsiiniterminite andmebaasi (MeSH) (kättesaadav aadressil http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Ainete liigitamiseks ühte või mitmesse tootekategooriasse kasutati USA riikliku meditsiiniraamatukogu ohtlike ainete andmebaasi (kättesaadav aadressil http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB.)
(7) DBP-d võib kasutada alternatiivse mitteseonduva kontrollainena suurimas kontsentratsioonis 10^{-4} M.
(8) Selle aine lahustuvuspiir on 10^{-4} M. Di-*n*-butüülftalaadi (DBP) kasutamine ja klassifitseerimine mitteseonduva ainena põhineb analüüsimisel kuni kontsentratsioonini 10^{-4} M, sest valideerimiseelsete uuringute käigus täheldati mõnes laboris, et aine on kontsentratsioonil 10^{-3} M mittelahustuv (nt ilmneb hägusus).

▼M8

Uuritava kemikaali lahustuvuse analüüsimine ja kontsentratsioonivahemiku kindlakstegemine

19. Iga uuritava kemikaali puhul tuleks teha eelkatse, et määrata lahustuvuspiir ja teha kindlaks katse läbiviimiseks sobiv kontsentratsioonivahemik. Iga uuritava kemikaali lahustuvuspiir tuleb algselt määrata lahustis ja seejärel tuleb kontrollida seda katsetingimustes. Katses kasutatav lõppkontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 1 mM. Kontsentratsioonivahemiku kindlakstegemise katses kasutatakse lahustiga kontrolli koos kaheksa järjestikuse üksteisest log-ühiku võrra erineva lahjendusega, mille puhul alustatakse maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM või väiksem, olenevalt lahustuvuspiirist), ja registreeritakse hägu või sademe tekkimine. Teises ja kolmandas katses tuleks kontsentratsioone vajaduse korral kohandada, et kontsentratsioonist sõltuvuse kõverat oleks võimalik paremini iseloomustada.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

20. Katse tunnistamine nõuetekohaseks või nõuetele mittevastavaks põhineb igas analüüsitsüklis kasutatud võrdlusöstrogeeni ja kontrollidega saadud tulemuste hindamisel. Esiteks peaks 1. plaadil olevate võrdluskontrollide täielikud kontsentratsioonikõverad igas analüüsitsüklis vastama lähenduskõvera parameetritega (nt IC_{50} ja Hilli tõus) seotud tulemusnäitajatele, mis põhinevad vastavates CERI ja FW meetodite kohastes katse-eeskirjades käsitletud tulemustel (2. ja 3. liide) ja katset läbi viivas laboris kontrollidega varem saadud andmetel. Kõik kontrollid (võrdlusöstrogeen, nõrgalt seonduv aine ja mitteseonduv aine) peaksid igas analüüsitsüklis olema õigesti liigitatud. Teiseks tuleb hinnata kõigil ülejäänud plaatidel olevate kontrollide andmete kooskõla 1. plaadi puhul saadud tulemustega. Tuleks kasutada piisavalt suurt uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku, et konkureeriva seondumise kõvera ülemine osa selgelt välja joonistuks. Paralleelproovide vaheline varieeruvus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ja kolme sõltumatu analüüsitsükli vaheline varieeruvus peaks olema mõõdukas ja teaduslikult põhjendatav. Katse järjepideva läbiviimise võimekuse tõendamiseks tuleks luua võrdlusöstrogeeni ja kontrolle iseloomustavate varasemate tulemuste andmebaas ja seda hallata. Laborisisese reprodutseeritavuse hindamiseks võib kasutada mitmest eri katsest pärinevate võrdlusöstrogeenile ja nõrgalt seonduvale kontrollainele vastavate lähenduskõverate parameetrite keskväärtuste standardhälbeid (SD) ja variatsioonikordajaid (CV). Plaatidel olevate kontrollidega saadud tulemuste hindamine igas analüüsitsüklis ja iga uuritava kemikaali puhul peaks põhinema eksperdihinnangul.

Lisaks tuleks juhinduda järgmistest katse nõuetekohasuse kriteeriumidega seotud põhimõtetest:

— andmed peaksid olema piisavad ERiga seondumise kvantitatiivseks hindamiseks;

— kasutatud kontsentratsioonid peaksid jääma uuritava kemikaali lahustuvusvahemikku.

Andmeanalüüs

21. Küllastava ja konkureeriva seondumise andmete analüüsimise kindlaksmääratud korra puhul tuleks järgida retseptor ja ligandi vaheliste interaktsioonide iseloomustamise aluspõhimõtteid. Tavaliselt kasutatakse küllastava seondumise andmete analüüsimiseks mittelineaarse regressiooni mudelit, milles võetakse arvesse summaarset ja mittespetsiifilist seondumist. B_{max}-i ja K_d määramisel võib olla vaja korrigeerida andmeid ligandi väljatõrjumise suhtes (nt Swillens, 1995 (19)). Konkureeriva seondumise katsete puhul kasutatakse tavaliselt transformeeritud andmeid (nt spetsiifiline seondumine protsentides

▼M8

ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (log M)). Iga uuritava kemikaali puhul tuleks IC_{50} hinnangulise logaritmitud väärtuse kindlakstegemiseks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparameetrilist Hilli võrrandit. Pärast esmast analüüsi tuleks määrata lähenduskõvera parameetrid ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Mõnel juhul võib olla vaja viia läbi täiendav analüüs, et leida parim lähenduskõver (nt kõvera ülemise ja/või alumise osa piiritlemine, 10 % reegli kasutamine; vt 4. liide ja allikas 2 (jaotis III.A.2)).

22. Katsete vastavus nõuetekohasuse kriteeriumidele (punkt 20) viitab sellele, et katsesüsteem töötab nõuetekohaselt, kuid sellega ei ole tagatud, et igas konkreetses katses saadavad andmed on täpsed. Esimese katse nõuetekohaste tulemuste korduvus on parim viide sellele, et saadud andmed on täpsed.

Üldised andmete tõlgendamise kriteeriumid

23. Praegu puudub ühtne kokkulepitud meetod ERiga seondumise andmete tõlgendamiseks. Siiski tuleks hrERi vahendatava mõju kvalitatiivsel (nt seonduv/mitteseonduv) ja/või kvantitatiivsel (nt log IC_{50}, suhteline seondumisafiinsus (RBA) jne) analüüsimisel lähtuda empiirilistest andmetest ja usaldusväärsest teaduslikust hinnangust.

Katseprotokoll

24. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

Analüüsimeetod:

— kasutatud analüüsimeetod.

Kontrollkemikaal / võrdluskemikaal / uuritav kemikaal:

— allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on teada;

— uuritava kemikaali püsivus, kui on teada;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui on teada;

— lisatud uuritava kemikaaliga söötme pH ja osmolaalsus ning sademe teke selles (vastavalt vajadusele);

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identifitseerimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB) või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest.

▼**M8**

Lahusti/kandeaine:

— kirjeldus (aine liik, tarnija ja partii);

— lahusti/kandeaine valiku põhjendus;

— uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines, kui see on teada.

Retseptorid:

— retseptorite päritolu (tarnija, kataloginumber, partii, retseptori liik, retseptori aktiivne kontsentratsioon tarnija andmetel, sertifikaat tarnijalt)

— retseptorite kirjeldus (sh küllastava seondumise tulemused): K_d, B_{max};

— retseptorite säilitamine.

— *Radiomärgistatud ligand:*

— tarnija, kataloginumber, partii, eriaktiivsus.

Katsetingimused:

— lahustuvuspiir katsetingimustes;

— seondumispuhvri koostis;

— retseptori kontsentratsioon;

— märgistusaine (st radiomärgistatud ligandi) kontsentratsioon;

— uuritava kemikaali kontsentratsioonid;

— kandeaine protsentuaalne sisaldus lõppkatses;

— inkubeerimise temperatuur ja kestus;

— meetod vaba aine eraldamiseks seondunud ainest;

— positiivsed ja negatiivsed kontrollid/võrdlusained;

— kriteeriumid, mille alusel katsetulemus liigitatakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks.

Nõuetekohasuse kontroll:

— paralleelsete positiivsete kontrollidega/võrdlusainetega saadud tegelikud IC_{50} ja Hilli tõusu väärtused.

Tulemused:

— algandmed ja andmed seondunud/vaba aine kohta;

— vajaduse korral denatureerumise kontrollimise tulemused;

— väikseim efektiivne kontsentratsioon (LEC), kui see on olemas;

— vastavalt vajadusele RBA ja/või IC_{50} väärtused;

— võimaluse korral mõju sõltuvus kontsentratsioonist;

— statistilise analüüsi tulemused, kui need on olemas, koos veamäära ja usaldusnivooga (nt keskväärtuse standardviga (SEM), SD, CV või usaldusvahemik usaldusnivool 95 %) ning kirjeldus selle kohta, kuidas need väärtused saadi.

▼M8

Tulemuste arutelu:

— 10 % reegli rakendamine.

Järeldused

KIRJANDUS

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα). Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 226. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα). Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 222. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(5) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric* 5 Suppl. 2: 20–26.

(6) Welboren, W. J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer* 16(4): 1073–1089.

(7) Younes, M., ja Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135(1): 63–66.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* 30(4): 293–342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. NIH Publication No 03-4504. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori, Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 22(1): 225–231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 67. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity – The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line. Jaapani Kemikaalide Hindamise ja Uurimise Instituut (CERI), Jaapan. Lk 1–188.

(15) Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., ja Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity. *Toxicol. Lett.* 146: 111–120.

(16) Kummer, V., Maskova, J., Zraly, Z., Neca, J., Simeckova, P., Vondracek, J., ja Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Lett.* 180: 213–221.

(17) Gozgit, J. M., Nestor, K. M., Fasco, M. J., Pentecost, B. T., ja Arcaro, K. F. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 196: 58–67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere* 34: 835–848.

(19) Swillens, S. (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis. *Mol. Pharmacol.* 47(6): 1197–1203.

▼**M8**

1. liide

MÕISTED JA LÜHENDID

10 % reegel – võimalus jätta analüüsist välja andmepunktid, kus [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilist seondumist iseloomustav paralleelproovide andmete keskväärtus on vähemalt 10 % suurem kui vastav keskväärtus mõnel väiksemal kontsentratsioonil (vt 4. liide).

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (1).

CV – variatsioonikordaja.

E2 – 17β-östradiool.

ER – östrogeeniretseptor.

hr-α-ER – rekombinantne inimese α-östrogeeniretseptor.

IC50 – kontsentratsioon, mille juures pärssiva uuritava kemikaali mõju on poole väiksem maksimaalsel efektiivsel kontsentratsioonil avalduvast mõjust.

ICCVAM – alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee.

Kemikaal – aine või segu.

Kontseptuaalne raamistik – OECD kontseptuaalne raamistik võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide analüüsimiseks ja hindamiseks.

Laborisisene reprodutseeritavus – näitaja, mis iseloomustab seda, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad saada konkreetset katse-eeskirja kasutades eri aegadel ühesuguseid tulemusi (1).

Laboritevaheline reprodutseeritavus – näitaja, mis iseloomustab seda, millisel määral suudavad eri pädevad laborid sama katse-eeskirja alusel samu aineid uurides saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelse ja valideerimisega seotud tegevuse käigus ja see näitab, millisel määral on katsemeetod eri laborites edukalt kasutatav (1).

LEC – väikseim efektiivne kontsentratsioon: uuritava kemikaali väikseim kontsentratsioon, mille juures kemikaal avaldab veel mõju (st uuritava kemikaali väikseim kontsentratsioon, mille juures mõju on statistiliselt erinev üksnes kandeainet sisaldava paralleelse kontrolli puhul täheldatavast mõjust).

Mina-ka-meetod – kõnekeelne väljend katsemeetodi kohta, mis on oma ülesehituselt ja funktsionaalsuse poolest sarnane valideeritud ja tunnustatud standardse katsemeetodiga. Seda väljendit kasutatakse sarnase katsemeetodi tähenduses.

Nõuetekohasuse kriteeriumid – katses kasutatavate kontrollide ja võrdlusstandardite minimaalsed tulemuslikkuse standardid. Katse nõuetekohaseks tunnistamiseks peaksid kõik nõuetekohasuse kriteeriumid olema täidetud.

▼M8

Pädevus – enne tundmatute ainete analüüsimist tõendatud võimekus katsemeetodi kohaseid katseid nõuetekohaselt läbi viia.

Pädevusained – tulemuslikkuse standarditega hõlmatud alarühm võrdlusaineid, mida võib laboris kasutada standardiseeritud analüüsimeetodi abil tehnilise pädevuse tõendamiseks. Nende ainete valikukriteeriumide hulka kuulub tavaliselt nõue, et nende ainete mõju tugevus oleks erinev, need oleksid turul kättesaadavad ja nende kohta oleksid olemas kvaliteetsed võrdlusandmed.

RBA – suhteline seondumisafiinsus. Aine RBAd väljendatakse aine IC_{50} logaritmitud väärtuse protsentuaalse osakaaluna 17β-östradiooli IC_{50} logaritmitud väärtusest.

SD – standardhälve.

Standardsed katsemeetodid – analüüsimeetodid, millele tuginetakse tulemusnäitajatel põhinevas katsejuhendis nr 493.

Tulemuslikkuse standardid – valideeritud katsemeetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse vaadeldava mehhanismi ja funktsionaalsuse poolest sarnase kavandatud katsemeetodi võrreldavust. Need hõlmavad 1) katsemeetodi olulisi elemente, 2) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja 3) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel (1).

Täpsus (vastavus) – katsetulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab analüüsimeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada õigete katsetulemuste osakaalu (1).

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideerimine – tegevus, mille käigus määratakse teatud kindla lähenemisviisi, meetodi, katsemudeli, protsessi või hindamisviisi usaldusväärsus ja asjakohasus kindlaksmääratud eesmärgil kasutamisel (1).

Valideeritud katsemeetod – katsemeetod, mille puhul valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetsel eesmärgil kasutamisel. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei pruugi olla täpsuse ja usaldusväärsuse poolest piisavalt tulemuslik, et seda saaks lugeda kavandatud eesmärgi puhul vastuvõetavaks (1).

Võrdlusöstrogeen – 17ß-östradiool (E2, CASi nr: 50-28-2).

Östrogeenne toime – kemikaali võime jäljendada 17β-östradiooli võimet seonduda östrogeeniretseptoriga. Käesolev katsemeetod võimaldab tuvastada seondumist inimese α-ERiga.

▼**M8**

2. liide

ÖSTROGEENIRETSEPTORIL (A-ER) PÕHINEVAD FREYBERGERI-WILSONI IN VITRO MEETODID KÜLLASTAVA JA KONKUREERIVA SEONDUMISE ANALÜÜSIMISEKS TÄISPIKA REKOMBINANTSE A-ER-I ABIL

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

1. Käesoleva östrogeeniretseptoril (α-ER) põhineva, küllastava ja konkureeriva seondumise analüüsimist võimaldava *in vitro* meetodi puhul kasutatakse täispikka inimese α-östrogeeniretseptorit (hr-α-ER), mille tootmiseks ja eraldamiseks on kasutatud bakuloviirusega nakatatud putukarakke. Freybergeri ja Wilsoni välja töötatud katse-eeskirja on hinnatud rahvusvahelises mitme labori osalusel läbi viidud valideerimisuuringus (2), mille käigus tõendati, et see analüüsimeetod on kavandatud kasutuseesmärgi puhul asjakohane ja usaldusväärne.

2. Käesolev meetod on rakendatav sõeluuringu jaoks, mille eesmärk on tuvastada aineid, mis on võimelised seonduma täispika hr-α-ERiga. Seda kasutatakse selleks, et hinnata uuritava kemikaali võimet konkureerida hr-α-ERile seondumisel 17β-östradiooliga. Kvantitatiivsed katsetulemused võivad hõlmata uuritava kemikaali IC_{50} (uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis on vajalik poole [^{3}H]17β-östradiooli väljatõrjumiseks hr-α-ERilt) ja suhtelist seondumisafiinsust hr-α-ERi suhtes võrreldes 17β-östradiooliga. Kemikaalide sõeluuringu puhul võivad vastuvõetavad kvalitatiivsed katsetulemused hõlmata uuritava kemikaali liigitamist hr-α-ERiga seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks lähtuvalt seondumiskõverate suhtes kohaldatavatest kriteeriumidest.

3. Käesoleva analüüsimeetodi puhul kasutatakse radioaktiivset ligandi, mille jaoks peab laboril olema radioaktiivsete materjalide käitlemise luba. Kõikide radioisotoopide ja ohtlike kemikaalidega tehtavate toimingute puhul tuleks järgida siseriiklikes õigusaktides kirjeldatud eeskirju ja korda.

4. Enne käesoleva meetodi kasutamist regulatiivsel eesmärgil tuleks lugeda peatükke „**ÜLDINE SISSEJUHATUS**“ ja „**hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID**“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

MEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

5. Inimese rekombinantse α-östrogeeniretseptoriga (hr-α-ER) seondumise analüüsimisel mõõdetakse radiomärgistatud ligandi ([^{3}H]17β-östradiool) võimet seonduda ERiga üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali (st konkureeriva ligandi) juuresolekul. Uuritavad kemikaalid, millel on ERi suhtes suur afiinsus, konkureerivad radiomärgistatud ligandiga väiksemal kontsentratsioonil kui kemikaalid, mille afiinsus retseptori suhtes on väiksem.

6. Kõnealune meetod hõlmab kahte põhielementi: küllastava seondumise katset, millega iseloomustatakse retseptori ja ligandi vahelise interaktsiooni parameetreid, ning sellele järgnevat konkureeriva seondumise katset, millega iseloomustatakse uuritava kemikaali ja radiomärgistatud ligandi vahelist konkurentsi ERile seondumisel.

7. Küllastava seondumise katse eesmärk on teha konkureeriva seondumise katse eel kindlaks konkreetse partii retseptorite seondumisafiinsus ja arv. Küllastava seondumise katses mõõdetakse tasakaalutingimustes teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava östrogeeniretseptori afiinsust loodusliku ligandi suhtes (seda väljendab dissotsiatsioonikonstant K_d) ja retseptori aktiivsete seondumiskohtade kontsentratsiooni (B_{max}).

▼M8

8. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse aine afiinsuse hindamiseks selle võimet konkureerida ERile seondumisel [^{3}H]17β-östradiooliga. Afiinsust väljendatakse uuritava kemikaali sellise kontsentratsiooni kaudu, mille juures kemikaal vähendab tasakaalutingimustes [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilist seondumist 50 % võrra (sellele vastab mõiste „50 % ulatuses inhibeeriv kontsentratsioon“ ehk IC_{50}). Afiinsust on võimalik hinnata ka suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) kaudu, mis määratakse samas analüüsitsüklis eraldi mõõdetud östradiooli IC_{50} suhtes. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava [^{3}H]17β-östradiooli seondumist laia vahemikku (kaheksat suurusjärku) hõlmavates kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Seejärel kohaldatakse saadud andmete suhtes võimaluse korral teatavat liiki Hilli võrrandit (Hill, 1910), millega kirjeldatakse radioligandi väljatõrjumist konkureeriva seonduva ainega, millel on üks seondumiskoht. Radiomärgistatud östradiooli väljatõrjumise ulatust tasakaalutingimustes kasutatakse uuritava kemikaali liigitamiseks seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks.

KATSE KÄIK

hr-α-ERi vastuvõetava funktsionaalsuse tõendamine

9. Enne küllastava seondumise ja konkureeriva seondumise katsete regulaarset kasutamist tuleks iga uue hr-α-ERi partii puhul tõendada selle nõuetekohast funktsionaalsust laboris, kus seda kasutama hakatakse. Funktsionaalsuse tõendamine peaks hõlmama kahte etappi. Need etapid on järgmised.

— Viiakse läbi [^{3}H]17β-östradiooli küllastava seondumise katse, et tõendada hr-α-ERi spetsiifilisust ja küllastumist. Nende andmete analüüsimisel mittelineaarse regressiooni teel (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja järgnevalt saadud Scatchardi graafiku alusel tuleks iga hr-α-ERi partii puhul dokumenteerida [^{3}H]17β-östradiooli seondumisafiinsus hr-α-ERi suhtes (K_d) ja retseptorite arv (B_{max}).

— Viiakse läbi konkureeriva seondumise katse kontrollainetega (võrdlusöstrogeen (17β-östradiool)), nõrgalt seonduv aine (nt noretünodreel või noretindroon) ja mitteseonduv aine (oktüültrietoksüsilaan (OTES)). Igas laboris tuleks luua varasemate tulemuste andmebaas, et võimaldada dokumenteerida võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine IC_{50} ja muude asjakohaste näitajate väärtuste kooskõla määra eri katsete lõikes ja hr-α-ERi eri partiide puhul. Kontrollaineid iseloomustavate konkureeriva seondumise kõverate parameetrid peaksid jääma usaldusnivoole 95 % vastavasse usaldusvahemikku (vt tabel 1), mis tehti kindlaks kõnealuse analüüsimeetodi valideerimise uuringus osalenud laborites saadud andmete põhjal (2).

Tabel 1.

FW meetodi kohases hrERiga seondumise katses võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine puhul kohaldatavad tulemuslikkuse kriteeriumid

Aine	Näitaja	Keskmine [a]	Standardhälve (*n*)	Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % [b]	
				Alampiir	Ülempiir
17β-östradiool	Maksimumväärtus (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Miinimumväärtus (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hilli tõus	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	Log IC_{50} (M)	-8,92 ()	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼**M8**

Aine	Näitaja	Keskmine [a]	Standardhälve (*n*)	Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % [b]	
				Alampiir	Ülempiir
Noretünodreel	Maksimumväärtus (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Miinimumväärtus (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hilli tõus	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindroon [c]	Maksimumväärtus (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Miinimumväärtus (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hilli tõus	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	Log IC_{50} (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] Keskmine ± standardhälve (SD) (n) on arvutatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparameetriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi valideerimisuuringu jooksul läbi neljas laboris (vt allikas 2, N lisa).

[b] Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on esitatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kehtestamise võimaldamiseks.

[c] Noretindrooni analüüsimine ei olnud valideerimisuuringus 4. alategevuse raames kohustuslik (vt allikas 2, 4. alategevus). Seega on keskmine ± SD (n) *arvutatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparameetriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi läbi kahes laboris.*
IC_{50} väärtuste vahemik sõltub konkreetses laboris kasutatava retseptoripreparaadi K_d väärtusest ja radiomärgistatud ligandi kontsentratsioonist. IC_{50} väärtuste vahemiku asjakohane kohandamine sõltuvalt katse läbiviimiseks kasutatud tingimustest on lubatud.

Labori pädevuse tõendamine

10. Tutvuge käesoleva katsemeetodi punktidega 17 ja 18 ning tabeliga 2 peatükis „**hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID**“. Iga katse (nii küllastava kui ka konkureeriva seondumise puhul) peaks koosnema kolmest eri päevadel läbi viidavast sõltumatust analüüsitsüklist (st kasutatakse retseptori, kemikaalide ja reaktiivide värskelt valmistatud lahjendusi) ja igas tsüklis tuleks kasutada kolme paralleelproovi.

Retseptori (hr-α-ER) kontsentratsiooni määramine

11. Aktiivse retseptori kontsentratsioon varieerub pisut eri partiide ja säilitustingimuste puhul. Seepärast tuleks määrata tarnijalt saadud aktiivse retseptori kontsentratsioon. See võimaldab kasutada katses sobivat aktiivse retseptori kontsentratsiooni.

12. Retseptorit tuleks konkureerivale seondumisele vastavates tingimustes (st 1 nM [^{3}H]östradiool) inkubeerida nominaalsel kontsentratsioonil 0,25, 0,5, 0,75 ja 1 nM ilma märgistamata östradioolita (summaarne seondumine) ja koos 1 µM märgistamata östradiooliga (mittespetsiifiline seondumine). Spetsiifiline seondumine, mis arvutatakse summaarse ja mittespetsiifilise seondumise vahena, esitatakse graafikul vastavuses retseptori nominaalse kontsentratsiooniga. Retseptori kontsentratsioon, mille puhul spetsiifilise seondumise määr vastab 20 protsendile lisatud radiomärgise kogusest, on seotud retseptori vastava nominaalse kontsentratsiooniga ja seda retseptori kontsentratsiooni tuleks kasutada küllastava ja konkureeriva seondumise katsetes. Sageli vastab nendele tingimustele hrERi lõppkontsentratsioon 0,5 nM.

▼M8

13. Kui 20 % kriteeriumi täitmine korduvalt ebaõnnestub, tuleks kontrollida katseplaani võimalike vigade suhtes. Suutmatus saavutada vastavust 20 % kriteeriumile võib viidata sellele, et rekombinantse valgu partiis on väga vähe aktiivset retseptorit, ning sel juhul tuleks kaaluda mõne muu retseptoripartii kasutamist.

Küllastava seondumise katse

14. [^{3}H]17β-östradiooli tuleks hindamiseks kasutada kaheksas eri kontsentratsioonis, iga kontsentratsiooni puhul kolmes paralleelis, ning kohaldada seejuures järgmist kolme tingimust (vt tabel 2).

— Seondumine märgistamata 17β-östradiooli puudumisel ja ERi juuresolekul. Nii määratakse summaarne seondumine, mida väljendab radioaktiivsus kannudes, kus on ainult [^{3}H]17β-östradiool.

— Seondumine märgistamata 17β-östradiooli juuresolekul 1000-kordses liias, võrreldes radiomärgistatud 17β-östradiooliga, ning ERi juuresolekul. Nende tingimuste puhul on eesmärk küllastada aktiivsed seondumiskohad märgistamata 17β-östradiooliga ja määrata kannudes radioaktiivsuse mõõtmise teel mittespetsiifiline seondumine. Radioaktiivse östradiooli mis tahes kogus, mis on veel võimeline retseptoriga seonduma, loetakse olevat seondunud mittespetsiifiliselt, sest märgistamata östradiooli kontsentratsioon peaks olema nii suur, et kõik saadaolevad spetsiifilise seondumise kohad retseptoril on hõivatud.

— Seondumine märgistamata 17β-östradiooli puudumisel ja ERi puudumisel (summaarse radioaktiivsuse määramine).

[^{3}H]17β-östradiooli ja märgistamata 17β-östradiooli lahuste valmistamine

15. [^{3}H]17β-östradiooli lahjenduste saamiseks tuleks 12 nM [^{3}H]17β-östradiooli põhilahusele analüüsipuhvri lisamise teel valmistada lahused, kus kontsentratsioon jääb algselt vahemikku 0,12 nM kuni 12 nM. Pärast 40 µl sellise lahuse lisamist 96-kannulise mikrotiiterplaadi vastavasse kannu (saadav lõppruumala on 160 µl) saadakse lahused lõpliku katsekontsentratsiooniga 0,03 kuni 3,0 nM. Analüüsipuhvri, [^{3}H]17β-östradiooli põhilahuse ja lahjenduste valmistamist ning kontsentratsiooni määramist on põhjalikult kirjeldatud FW meetodi kohases katse-eeskirjas (2).

16. Etanoolis lahustatud 17β-östradiooli lahjenduste saamiseks tuleks analüüsipuhvri lisamise teel valmistada kaheksa eri kontsentratsioonidega lahust, mille kontsentratsioon jääb algselt vahemikku 0,06 µM kuni 6 µM. Pärast 80 µl sellise lahuse lisamist 96-kanulise mikrotiiterplaadi vastavasse kannu (saadav lõppruumala on 160 µl) saadakse lahused lõpliku katsekontsentratsiooniga 0,03 µM kuni 3 µM. Märgistamata 17β-östradiooli lõppkontsentratsioon igas mittespetsiifilise seondumise mõõtmiseks kasutatavas kannus peaks olema 1000 korda suurem kui märgistatud [^{3}H]17β-östradiooli kontsentratsioon. Märgistamata 17β-östradiooli lahjenduste valmistamist on põhjalikult kirjeldatud FW meetodi kohases katse-eeskirjas (2).

17. Tuleks kasutada retseptori sellist nominaalset kontsentratsiooni, mille puhul spetsiifiline seondumine on 20 ± 5 % (vt punktid 12–13). hr-α-ERi lahus tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

18. 96-kannulised mikrotiiterplaadid valmistatakse ette vastavalt tabelis 2 esitatud skeemile, kus iga kontsentratsiooni puhul kasutatakse kolme paralleelproovi. Näide plaadil kasutatavate [^{3}H]17β-östradiooli, märgistamata 17β-östradiooli, puhvri ja retseptori kontsentratsioonide ja koguste kohta on esitatud liites 2.2.

▼M8

Tabel 2.

Küllastava seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H]E2 + ER			0,06 nM [^{3}H]E2 + ER			0,08 nM [^{3}H]E2 + ER			0,10 nM [^{3}H]E2 + ER			Summaarne seondumine(ainult lahusti)
B	0,30 nM [^{3}H]E2 + ER			0,60 nM [^{3}H]E2 + ER			1,0 nM [^{3}H]E2 + ER			3,0 nM [^{3}H]E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [3H]E2 + ER + 0,10 µM E2			Mittespetsiifiline seondumine
E	0,30 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H]E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [^{3}H]E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G													
H													

[^{3}H]E2 – [^{3}H]17β-östradiool
ER – östrogeeniretseptor
E2 – märgistamata 17β-östradiool

19. Katses kasutatavaid mikrotiiterplaate tuleks inkubeerida pöördloksutil 2–8 °C juures 16 kuni 20 tundi.

hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiooli koguse mõõtmine

20. hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiooli eraldamiseks vabast [^{3}H]17β-östradioolist tuleks lisada igasse kannu 80 µl külma DCC suspensiooni, loksutada mikrotiiterplaate 10 minutit ja tsentrifuugida neid 10 minutit kiirusel umbes 2500 pööret minutis. Et vähendada seondunud [^{3}H]17β-östradiooli dissotsieerumist hr-α-ERilt eraldamisprotsessi käigus, on väga oluline hoida puhvreid ja analüüsitavaid kanne temperatuuril 2–8 °C ning viia kõik etapid läbi kiirelt. Mikrotiiterplaadiloksuti on vajalik, et plaate tõhusalt ja kiiresti töödelda.

21. Seejärel tuleks DCC puudutamisest tuleneda võiva kannude saastumise ärahoidmiseks väga ettevaatlikult võtta 50 µl supernatanti, mis sisaldab hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiooli, ning kanda see teisele mikrotiiterplaadile.

22. Seejärel lisatakse igasse kannu (A1–B12 ja D1–E12) 200 µl stsintillatsioonivedelikku, mis on võimeline muutma tuumakiirguse kineetilise energia valgusenergiaks. Mõõteplaadi kannudesse G1–H12 (kasutatakse summaarse radioaktiivsuse mõõtmiseks) tuleks otse stsintillatsioonivedelikku lisada [^{3}H]17β-östradiooli lahused (40 µl) järjestikuste lahjendustena, nagu on näidatud tabelis 3; need kannud sisaldavad seega üksnes 200 µl stsintillatsioonivedelikku ja vastava lahjendusastmega [^{3}H]17β-östradiooli lahust. Nendest kannudest saadud andmetest nähtub, kui palju [^{3}H]17β-östradiooli (mõõdetuna dpm-des) lisati iga rühma kannudesse summaarse seondumise ja mittespetsiifilise seondumise hindamiseks.

▼M8

Tabel 3.

Küllastava seondumise katses radioaktiivsuse mõõtmisel kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H]E2 + ER			0,06 nM [^{3}H]E2 + ER			0,08 nM [^{3}H]E2 + ER			0,10 nM [^{3}H]E2 + ER			Summaarne seondumine(ainult lahusti)
B	0,30 nM [^{3}H]E2 + ER			0,60 nM [^{3}H]E2 + ER			1,0 nM [^{3}H]E2 + ER			3,0 nM [^{3}H]E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [3H]E2 + ER + 0,10 µM E2			Mittespetsiifiline seondumine
E	0,30 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H]E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H]E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [^{3}H]E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G	0,03 nM [3H]E2 (summaarne radioaktiivsus dpm-des)			0,06 nM [3H]E2			0,08 nM [3H]E2			0,10 nM [3H]E2			Summaarne radioaktiivsus dpm-des (*)
H	0,30 nM [^{3}H]E2			0,60 nM [^{3}H]E2			1,0 nM [^{3}H]E2			3,0 nM [^{3}H]E2			

[^{3}H]E2 – [^{3}H]17β-östradiool

ER – östrogeeniretseptor

E2 – märgistamata 17β-östradiool

dpm – lagunemiste arv minutis

(*) Kannudes G1–H12 tuleks [^{3}H]-ga märgistatud radioaktiivse östradiooli lahused lisada järjestikuste lahjendustena otse 200 mikroliitrile stsintillatsioonivedelikule.

23. Mõõtmist tuleks alustada pärast vähemalt kahe tunni pikkust viivitust ja loendamisaeg peaks olema 40 minutit kannu kohta. Radioaktiivsuse mõõtmiseks dpm-des kannu kohta tuleks kasutada mikrotiiterplaadi stsintillatsiooniloendurit ja võtta seejuures arvesse sumbumisparandit. Kui mikrotiiterplaadi stsintillatsiooniloendur ei ole kättesaadav, võib proovide analüüsimiseks kasutada tavalist loendurit. Sellisel juhul võib kaaluda loendamisaja lühendamist.

Konkureeriva seondumise katse

24. Konkureeriva seondumise katse käigus mõõdetakse ühel kontsentratsioonil kasutatava [^{3}H]17β-östradiooli seondumist üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Igas analüüsitsüklis tuleks iga kontsentratsiooni puhul kasutada üheaegselt kolme paralleelproovi. Lisaks tuleks iga uuritava kemikaaliga läbi viia kolm järjestikust analüüsitsüklit. Katse läbiviimiseks tuleks kasutada ühte või mitut 96-kannulist mikrotiiterplaati.

Kontrollid

25. Katse läbiviimisel tuleks igas analüüsitsüklis kasutada paralleelset lahustiga kontrolli ja teisi kontrolle (st võrdlusöstrogeeni, nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet). Igas analüüsitsüklis tuleks ühel plaadil kasutada võrdlusöstrogeeni ja kontrollaineid (st nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet) täieliku kontsentratsioonikõvera ulatuses. Kõikidele ülejäänud plaatidele tuleks kanda i) E2 ja nõrgalt seonduv aine suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas) ja keskmises (umbes IC_{50}-le vastavas) kontsentratsioonis kolmes paralleelis ning ii) lahustiga kontroll ja mittespetsiifilise seondumise kontroll, kumbki vähemalt kolmes paralleelis. Analüüsipuhvri, kontrollide, [^{3}H]17β-östradiooli, hr-α-ERi ja uuritava kemikaali lahuste valmistamist on kirjeldatud allikas 2 (K lisa; vt FW meetodi kohane katse-eeskiri).

▼**M8**

Lahustiga kontroll

26. Lahustiga kontroll võimaldab tõendada, et lahusti ei mõjuta katsesüsteemi, ja ühtlasi mõõta summaarset seondumist (SS). Eelistatud lahusti on etanool. Kui uuritav kemikaal on suurimal kontsentratsioonil etanoolis mittelahustuv, võib lahustina kasutada DMSOd. Etanooli või DMSO lõppkontsentratsioon katsekannudes on 1,5 %; see ei tohi olla suurem kui 2 %.

Puhvrikontroll

27. Puhvrikontroll (PK) ei tohiks sisaldada lahustit ega uuritavat kemikaali, kuid peaks sisaldama kõiki teisi analüüsikomponente. Puhvrikontrolliga saadud tulemusi võrreldakse lahustiga kontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta analüüsisüsteemi.

Tugevalt seonduv aine (võrdlusöstrogeen)

28. 17β-östradiool (CASi nr: 50-28-2) on ERi endogeenne ligand ja seondub retseptori α-vormiga suure afiinsusega. Igas hr-α-ERiga tehtavas konkureeriva seondumise katses tuleks kasutada märgistamata 17β-östradiooli standardkõverat, et oleks võimalik hinnata katsetulemuste varieeruvust samas laboris pikema aja jooksul. Märgistamata 17β-östradioolist tuleks katsekannudes kasutamiseks valmistada etanoolis kaheksa lahust kontsentratsioonivahemikus 100 nM kuni 10 pM (-7 [log M] kuni -11 [log M]); lahuste kontsentratsioonid on järgmised: -7 [log M], -8 [log M], -8,5 [log M], -9 [log M], - 9,5 [log M], -10 [log M], -11 [log M]. Märgistamata 17β-östradiooli suurimat kontsentratsiooni (1 μM) kasutatakse ka mittespetsiifilise seondumise hindamiseks. See kontsentratsioon on tabelis 4 tähistatud märgisega „MSS“, kuigi see on samuti osa standardkõverast.

Nõrgalt seonduv aine

29. Igas analüüsitsüklis tuleks tundlikkuse tõendamiseks ja pikema aja jooksul saadud tulemuste varieeruvuse hindamiseks kasutada ka nõrgalt seonduvat ainet (noretünodreeli (CASi nr: 68-23-5) või noretindrooni (CASi nr: 68-22-4)). Nõrgalt seonduvast ainest tuleks katsekannudes kasutamiseks valmistada etanoolis kaheksa lahust kontsentratsioonvahemikus 3 nM kuni 30 μM (-8,5 [log M] kuni -4,5 [log M]); lahuste kontsentratsioonid on järgmised: -4,5 [log M], -5 [log M], -5,5 [log M], -6 [log M], -6,5 [log M], -7 [log M], -7,5 [log M], -8,5 [log M].

Mitteseonduv aine

30. Negatiivse kontrollina (mitteseonduva ainena) tuleks kasutada oktüültrietoksüsilaani (OTES; CASi nr: 2943-75-1). Sellega tagatakse, et katse käigus on võimalik tuvastada hr-α-ERiga mitteseonduvaid uuritavaid kemikaale. Mitteseonduvast ainest tuleks katsekannudes kasutamiseks valmistada etanoolis kaheksa lahust log-ühiku kaupa suurenevate kontsentratsioonide vahemikus 0,1 nM kuni 1000 μM (-10 [log M] kuni -3 [log M]). Alternatiivse mitteseonduva ainena võib kasutada di-*n*-butüülftalaati (DBP). Selle maksimaalne lahustuvus on teadaolevalt -4 [log M].

hr-α-ERi kontsentratsioon

31. Tuleks kasutada sellist retseptori kogust, mille puhul spetsiifiline seondumine radioligandi kontsentratsioonil 1 nM on 20 ± 5 % (vt 2. liite punktid 12–13). hr-α-ERi lahus tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

[^{3}H]17β-östradiool

32. [^{3}H]17β-östradiooli kontsentratsioon katsekannudes peaks olema 1,0 nM.

▼M8

Uuritavad kemikaalid

33. Iga uuritava kemikaali puhul on esmalt vaja läbi viia lahustuvuskatse, et määrata lahustuvuspiir ja teha kindlaks katse-eeskirja järgimiseks sobiv kontsentratsioonivahemik. Iga uuritava kemikaali lahustuvuspiir tuleb algselt määrata lahustis ja seejärel kontrollida seda katsetingimustes. Katses kasutatav lõppkontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 1 mM. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kasutatakse lahustiga kontrolli koos kaheksa järjestikuse üksteisest log-ühiku võrra erineva lahjendusega, mille puhul alustatakse maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM või väiksem, olenevalt lahustuvuspiirist), ja registreeritakse nähtava hägu või sademe tekkimine (vt ka punkt 35). Uuritava kemikaali analüüsimiseks tuleks kasutada eelnevas kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kindlaks tehtud kaheksal järjestikusel üksteisest log-ühiku võrra erineval kontsentratsioonil põhinevat kõverat. Teises ja kolmandas katses tuleks kontsentratsioone vajaduse korral kohandada, et kontsentratsioonist sõltuvuse kõverat oleks võimalik paremini iseloomustada.

34. Uuritava kemikaali lahjendused tuleks valmistada sobivas lahustis (vt 2. liite punkt 26). Kui uuritav kemikaal ei lahustu suurimal kontsentratsioonil etanoolis ega DMSO-s ja suurema koguse lahusti lisamisel tõuseks lahusti sisaldus lõpplahuses üle lubatud piirmäära, võib suurima kontsentratsioonina kasutada lahjenduste reas järgmist väiksemat kontsentratsiooni. Sellisel juhul võib lisada kontsentratsioonirea lahjemasse otsa ühe lisalahjenduse. Teised kontsentratsioonid lahjenduste reas tuleks jätta muutmata.

35. Uuritava kemikaali lahuseid tuleks pärast katsekannu lisamist hoolikalt jälgida, sest uuritav kemikaal võib kannu lisamisel välja sadeneda. Kõigi sadet sisaldavate kannude andmed tuleks kõvera lähendamisel välja jätta ja registreerida andmete väljajätmise põhjus.

36. Kui eelnevalt on olemas muudest allikatest pärinev teave uuritava kemikaali log IC_{50} kohta, võib olla asjakohane kasutada lahjenduste geomeetrilist jaotust eeldatava log IC_{50} ümber (nt sammuga 0,5 log-ühikut). Lõpptulemuses peaks kajastuma piisav kontsentratsioonide ulatus kummalgi pool log IC_{50} väärtust, sealhulgas kõvera ülemine ja alumine osa, nii et seondumiskõverat oleks võimalik piisavalt iseloomustada.

Katseplaatide kasutusskeemid

37. Mikrotiiterplaatide ettevalmistamisel tuleks need tähistada koodidega, mis vastavad lahustiga kontrollile, võrdlusöstrogeeni suurimale kontsentratsioonile – selle abil hinnatakse ühtlasi mittespetsiifilist seondumist (MSS) – ja puhvrikontrollile, mida kõiki kasutatakse kuues paralleelis, ning igale kontsentratsioonile kaheksast mitteseonduva kontrollaine (oktüültrietoksüsilaani) kontsentratsioonist, võrdlusöstrogeeni seitsmest väiksemast kontsentratsioonist, nõrgalt seonduva aine kaheksast kontsentratsioonist ja iga uuritava kemikaali (UK) kaheksast kontsentratsioonist, mida kõiki kasutatakse kolmes paralleelis. Võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid hõlmav plaadi näidisskeem on esitatud tabelis 4. Uuritavate kemikaalide analüüsimiseks kasutatakse eraldi mikrotiiterplaate, mis peaksid sisaldama ka järgmisi plaadikontrolle: 1) E2 ja nõrgalt seonduvat ainet suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas) ja keskmises (umbes IC_{50}-le vastavas) kontsentratsioonis, kõikidel juhtudel kolmes paralleelis; 2) lahustiga kontrolli ja mittespetsiifilise seondumise kontrolli, kummalgi juhul kuues paralleelis (tabel 5). Konkureeriva seondumise katses kasutatavale mikrotiiterplaadi skeemile vastav näidistööleht kolme tundmatu uuritava kemikaali analüüsimiseks on esitatud liites 2.3. Tabelites 4 ja 5 on esitatud katses kasutatavad

▼M8

lõppkontsentratsioonid. E2 maksimaalne kontsentratsioon peaks olema 1 × 10^{-7} M ja nõrgalt seonduva aine puhul tuleks kasutada 1. plaadil kasutatud suurimat kontsentratsiooni. IC_{50} tuleb laboris määrata kontrollidega varem saadud tulemuste andmebaasi alusel. Eeldatavalt on see väärtus sarnane valideerimisuuringutes täheldatud väärtusega (vt tabel 1).

Tabel 4.

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem, mis hõlmab võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid (1. plaat)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SS (ainult lahusti)			SS (ainult lahusti)			MSS			MSS		
B	E2 (1 × 10^{-7})			E2 (1 × 10^{-8})			E2 (1 × $10^{-8,5}$)			E2 (1 × 10^{-9})		
C	E2 (1 × $10^{-9,5}$)			E2 (1 × 10^{-10})			E2 (1 × 10^{-11})			Tühi kann (*)		
D	NE (1 × $10^{-4,5}$)			NE (1 × 10^{-5})			NE (1 × $10^{-5,5}$)			NE (1 × 10^{-6})		
E	NE (1 × $10^{-6,5}$)			NE (1 × 10^{-7})			NE (1 × $10^{-7,5}$)			NE (1 × $10^{-8,5}$)		
F	OTES (1 × 10^{-3})			OTES (1 × 10^{-4})			OTES (1 × 10^{-5})			OTES (1 × 10^{-6})		
G	OTES (1 × 10^{-7})			OTES (1 × 10-8)			OTES (1 × 10^{-9})			OTES (1 × 10^{-10})		
H	Tühiproov (radiomärgise jaoks) (**)			Tühiproov (radiomärgise jaoks) (**)			Puhvrikontroll			Puhvrikontroll		

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).
(*) Täiesti tühi kasutamata kann.
(**) Tühiproov, mida ei kasutata inkubeerimise ajal, kuid mida kasutatakse lisatud radiomärgise summaarse radioaktiivsuse kontrollimiseks.

Tabel 5.

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem, mis hõlmab uuritavate kemikaalide täielikke kontsentratsioonikõveraid ja plaadikontrolle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SS (ainult lahusti)			SS (ainult lahusti)			MSS			MSS		
B	UK1 (1 × 10^{-3})			UK1 (1 × 10^{-4})			UK1 (1 × 10^{-5})			UK1 (1 × 10^{-6})		
C	UK1 (1 × 10^{-7})			UK1 (1 × 10^{-8})			UK1 (1 × 10^{-9})			UK1 (1 × 10^{-10})		
D	UK2 (1 × 10^{-3})			UK2 (1 × 10^{-4})			UK2 (1 × 10^{-5})			UK2 (1 × 10^{-6})		
E	UK2 (1 × 10^{-7})			UK2 (1 × 10^{-8})			UK2 (1 × 10^{-9})			UK2 (1 × 10^{-10})		
F	UK3 (1 × 10^{-3})			UK3 (1 × 10^{-4})			UK3 (1 × 10^{-5})			UK3 (1 × 10^{-6})		
G	UK3 (1 × 10^{-7})			UK3 (1 × 10^{-8})			UK3 (1 × 10^{-9})			UK3 (1 × 10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE (1 × $10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1 × 10^{-7})		

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

▼M8

Konkureeriva seondumise katse lõpetamine

38. Nagu on näidatud tabelis 6, tuleks kannudesse lisada 80 µl lahustiga kontrolli, puhvrikontrolli, võrdlusöstrogeeni, nõrgalt seonduvat ainet, mitteseonduvat ainet ja uuritavaid kemikaale, mille lahused on valmistatud analüüsipuhvris. Seejärel lisatakse igasse kannu 40 µl 4 nM [^{3}H]17β-östradiooli lahust. Pärast 10 kuni 15 minuti pikkust tasast loksutamist temperatuuril 2–8 °C tuleks lisada 40 µl hr-α-ERi lahust. Katses kasutatavaid mikrotiiterplaate tuleks inkubeerida pöördloksutil 2–8 °C juures 16 kuni 20 tundi.

Tabel 6.

hrERil põhineva konkureeriva seondumise katse komponentide kogused mikrotiiterplaadil

Kogus (µl)	Koostisosa
80	Märgistamata 17β-östradiool, noretünodreel, OTES, uuritav kemikaal, lahusti või puhver
40	4 nM [^{3}H]17β-östradiooli lahus
40	Määratud kontsentratsiooniga hr-α-ERi lahus
160	***Lõppruumala igas katsekannus***

39. Seejärel tuleks viia läbi hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiooli kvantifitseerimine pärast seda, kui hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiool on eraldatud vabast [^{3}H]17β-östradioolist igasse kannu 80 µl külma DCC suspensiooni lisamise teel, nagu on kirjeldatud küllastava seondumise katset käsitlevates punktides 20–23.

40. Kannusid H1–H6 (tabelis 4 tähistatud kui tühiproovid (radiomärgise jaoks)) kasutatakse 40 µl [^{3}H]-ga märgistatud östradiooli radioaktiivsuse määramiseks dpm-des. 40 µl suurused alikvoodid tuleks lisada otse kannudes H1–H6 olevasse stsintillatsioonivedelikku.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Küllastava seondumise katse

41. Spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma [^{3}H]17β-östradiooli kontsentratsiooni suurenedes platoole; see viitab hr-α-ERi küllastumisele ligandiga.

42. Spetsiifiline seondumine [^{3}H]17β-östradiooli kontsentratsioonil 1 nM peaks jääma vastuvõetavasse vahemikku 15–25 % eri analüüsitsüklites mõõdetud, lisatud radiomärgise kogusele vastava summaarse radioaktiivsuse näitajate keskväärtusest. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüüsitsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüüsitsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugele, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada ja küllastamiskatset korrata.

43. Andmed peaksid võimaldama saada lineaarse Scatchardi graafiku.

44. Mittespetsiifiline seondumine ei tohi olla liiga ulatuslik. Mittespetsiifilise seondumise määr on tavaliselt < 35 % summaarse seondumise määrast. See suhtarv võib siiski olla aeg-ajalt suurem, kui mõõdetakse väga väikest dpm-des väljendatavat radioaktiivsust radiomärgistatud 17β-östradiooli väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil.

▼M8

Konkureeriva seondumise katse

45. Märgistamata 17β-östradiool peaks kontsentratsiooni suurenedes tõrjuma [^{3}H]17β-östradiooli retseptorilt välja viisil, mis vastab konkureerivale seondumisele ühes seondumiskohas.

46. Võrdlusöstrogeeni (st 17β-östradiooli) IC_{50} väärtus peaks olema ligikaudselt võrdne [^{3}H]17β-östradiooli molaarse kontsentratsiooni ja küllastava seondumise katses määratud K_d summaga.

47. Spetsiifiline seondumine peaks järjepidevalt olema vastuvõetavas vahemikus 20 ± 5 %, kui igas kannus täheldatavale summaarsele radioaktiivsusele vastav lisatud radiomärgise keskmine mõõdetud kontsentratsioon on eri analüüsitsüklite lõikes 1 nM. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüüsitsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüüsitsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugele, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada.

48. Lahusti ei tohiks mõjutada analüüsimeetodi tundlikkust ega tulemuste reprodutseeritavust. Lahustiga kontrolliga (SSi kannudega) saadud tulemusi võrreldakse puhvrikontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta katsesüsteemi. Kui lahustil puudub mõju katsetulemustele, peaksid SSi proove ja puhvrikontrolli iseloomustavad tulemused olema võrreldavad.

49. Mitteseonduv aine ei tohiks tõrjuda hr-α-ERilt välja rohkem kui 25 % [^{3}H]17β-östradioolist, kui sellist ainet analüüsitakse kontsentratsioonil kuni 10^{-3} M (OTES) või 10^{-4} M (DBP).

50. Tulemuslikkuse kriteeriumide väljatöötamiseks võrdlusöstrogeeni ja kahe nõrgalt seonduva aine (nt noretünodreeli ja noretindrooni) jaoks on kasutatud hrERiga seondumist analüüsida võimaldava FW meetodi valideerimise uuringu andmeid (allikas 2, N lisa). Valideerimisuuringus osalenud laborites tehtud kõikide kontrollkatsete tulemuste puhul on keskväärtuse (n) ± SD kõrval esitatud ka usaldusvahemik usaldusnivool 95 %. Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on arvutatud võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduvaid aineid iseloomustavate lähenduskõvera parameetrite (st maksimumi, miinimumi, Hilli tõusu, log IC_{50}) jaoks ning võrdlusöstrogeeni suhtes väljendatava nõrgalt seonduvate ainete $\log_{10}$ RBA jaoks ning seda näitajat kasutatakse positiivsete kontrollide puhul tulemuslikkuse kriteeriumina. Tabelis 1 on esitatud tulemuslikkuse kriteeriumidena kasutatavate lähenduskõvera parameetrite eeldatavad väärtusevahemikud. Praktikas võib IC_{50} väärtuste vahemik retseptoripreparaadi K_d-st ja ligandi kontsentratsioonist sõltuvalt pisut varieeruda.

51. Uuritavate kemikaalide jaoks ei ole lähenduskõvera parameetreid käsitlevaid tulemuslikkuse kriteeriume kindlaks määratud, kuna olemasolevate võimalike uuritavate kemikaalide hulk on lai ning nende võimalik afiinsus ja saadavad tulemused varieeruvad (nt täielik kõver, osaline kõver, sobiva kõvera puudumine). Uuritava kemikaaliga igas analüüsitsüklis saadud tulemuste hindamisel tuleks siiski lähtuda eksperdihinnangust. Tuleks kasutada piisavalt suurt uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku, et konkureeriva seondumise kõvera ülemine osa (nt osa, kus seondumine on 90–100 %) selgelt välja joonistuks. Paralleelproovide vaheline varieeruvus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ja kolme järjestikuse analüüsitsükli vaheline varieeruvus peaks olema mõõdukas ja teaduslikult põhjendatav. Uuritava kemikaali hindamisel peaksid kontrollidega saadud tulemused igas analüüsitsüklis ligilähedaselt vastama FW meetodit iseloomustavatele tulemusnäitajatele ja olema kooskõlas asjaomases laboris kontrollidega varem saadud tulemustega.

▼M8

ANDMEANALÜÜS

Küllastava seondumise katse

52. Mõõdetakse nii summaarset kui ka mittespetsiifilist seondumist. Nende väärtuste põhjal arvutatakse üha suuremas kontsentratsioonis esineva [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilise seondumise näitaja tasakaalutingimustes; selleks lahutatakse summaarse seondumise näitajast mittespetsiifilise seondumise näitaja. [^{3}H]17β-östradiooli kontsentratsioonist sõltuva spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma platoole, kus [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine on hr-α-ERi küllastumisest tulenevalt maksimaalne. Lisaks peaks andmeanalüüsist nähtuma [^{3}H]17β-östradiooli seondumine ühteainsasse suure afiinsusega seondumiskohta. Küllastava seondumise graafikul peaks olema näidatud mittespetsiifiline, summaarne ja spetsiifiline seondumine. Järgnevas andmeanalüüsis tuleks kasutada mittelineaarset regressiooni (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja andmed tuleks lõplikul kujul esitada Scatchardi graafikul.

53. Andmeanalüüsi käigus tuleks määrata B_{max} ja K_d üksnes summaarse seondumise andmete põhjal ning lähtuda seejuures eeldusest, et mittespetsiifiline seondumine on lineaarne, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus teistsuguse meetodi kasutamise kohta. Lisaks tuleks parima lähenduskõvera leidmiseks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Tuleks märkida, millist robustse regressioonanalüüsi meetodit kasutatakse. Küllastava seondumise andmete alusel B_{max}-i ja K_d määramisel tuleks andmeid alati korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes (nt meetodi abil, mida on kirjeldanud Swillens (1995)).

Konkureeriva seondumise katse

54. Konkureeriva seondumise kõver esitatakse graafikul nii, et ühel teljel on [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine ja teisel konkureeriva aine kontsentratsioon (log_{10}-ühikutes). Uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine on 50 % maksimummäärast, on IC_{50} väärtus.

55. Positiivsete kontrollide (nt võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine) log IC_{50} hinnanguliste väärtuste kindlakstegemiseks tuleks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparameetrilist Hilli võrrandit (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Kõnealuste kõverate lähendamisel tuleks kõvera ülemine ja alumine osa, tõus ja log IC_{50} üldjuhul jätta piiritlemata. Parima lähenduskõvera leidmiseks tuleks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Andmeid ei tohiks korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes. Pärast esmast analüüsi tuleks iga seondumiskõver üle vaadata, et veenduda mudeli ja andmete omavahelises sobivuses. Nõrgalt seonduva aine suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) leidmiseks tuleks arvutada nõrgalt seonduva aine log IC_{50} väärtuse protsentuaalne osakaal 17β-östradiooli log IC_{50} väärtusest. Positiivsete kontrollidega ja mitteseonduval ainel põhineva kontrolliga saadud tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt käesoleva 2. liite punktide 45–50 kohastest katsemeetodi tulemuslikkuse näitajatest.

56. Kõigi uuritavate kemikaalide andmete analüüsimisel tuleks kasutada astmelist lähenemist, et tagada andmete asjakohane analüüs ja kõigi konkureeriva seondumise kõverate nõuetekohane liigitamine. Soovitatavalt tuleks uuritava kemikaaliga läbi viidud iga analüüsitsükli puhul esmalt rakendada täpselt sama standardiseeritud andmeanalüüsi, mida kasutatakse võrdlusöstrogeenil ja nõrgalt seonduval ainel põhinevate kontrollide puhul (vt eespool punkt 55). Pärast esmast analüüsi tuleks iga analüüsitsükli puhul teha lähenduskõvera parameetrite tehniline kontroll ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Tehnilise kontrolli käigus täheldatav kontsentratsioonist sõltuv [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilise seondumise protsentuaalse määra vähenemine, tehniliste paralleelproovide andmete vaheline väike varieeruvus kemikaali kõigil kontsentratsioonidel ja lähenduskõvera parameetrite sarnased väärtused kolmes analüüsitsüklis viitavad sellele, et katse ja andmeanalüüs on läbi viidud nõuetekohaselt.

▼**M8**

Andmete tõlgendamine

57. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr-α-ERiga seonduvaks, kui seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 % (joonis 1).

58. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr-α-ERiga mitteseonduvaks, kui:

— seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on suurem kui 75 % või

— sobiv seondumiskõver puudub ja väikseim silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas on suurem kui 75 %.

59. Kui ükski eespool kirjeldatud tingimus ei ole täidetud (nt lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on vahemikus 75–50 %), liigitatakse uuritav kemikaal ebaselgeks.

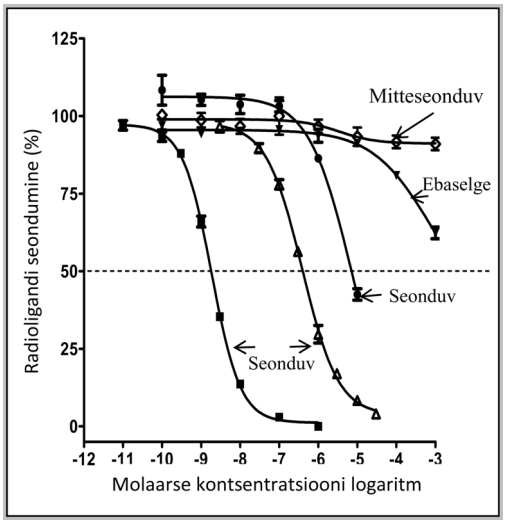
Tabel 7.

Uuritava kemikaali konkureeriva seondumise kõveral põhinevad liigitamiskriteeriumid

Liigitus	Kriteeriumid
Seonduv[a]	Seondumiskõver sobitub andmetega. **Katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 %.**
Mitteseonduv[b]	Seondumiskõvera sobitumisel andmetega on **katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus suurem kui 75 %**. Sobiva seondumiskõvera puudumisel on **väikseim silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas suurem kui 75 %**.
Ebaselge[c]	Ükskõik millises nõuetekohases analüüsitsüklis saadud tulemus, mille alusel ei saa uuritavat kemikaali liigitada seonduvaks aineks ega mitteseonduvaks aineks (näiteks vastab lähendatud sõltuvuskõvera madalaim punkt väärtusele 75–50 %).

Joonis 1

Näited uuritava kemikaali liigitamise kohta konkureeriva seondumise kõvera alusel



▼**M8**

60. Samas laboris uuritava kemikaaliga läbi viidud mitme analüüsitsükli tulemuste kokkuvõtmiseks omistatakse iga analüüsitsükli tulemusele arvväärtus ja leitakse nende arvväärtuste keskmine, nagu on kirjeldatud tabelis 8. Igas laboris analüüsitsüklite tulemuste koondamisel saadud tulemust võrreldakse iga uuritava kemikaali puhul eeldatava liigitamistulemusega.

Tabel 8.

Meetod uuritava kemikaali liigitamiseks samas laboris läbi viidud mitme analüüsitsükli alusel

Iga analüüsitsükli tulemusele väärtuse omistamine	
Liigitus	**Arvväärtus**
Seonduv	2
Ebaselge	1
Mitteseonduv	0
Liigitamine eri analüüsitsüklites saadud arvväärtuste keskmise alusel	
Liigitus	**Arvväärtus**
Seonduv	Keskmine $\geq$ 1,5
Ebaselge	0,5 $\leq$ keskmine $<$ 1,5
Mitteseonduv	Keskmine $<$ 0,5

KATSEPROTOKOLL

61. Vt käesoleva katsemeetodi punkt 24 peatükis „**hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID**“.

▼**M8**

Liide 2.1

MÕISTETE LOETELU

[^{3}H]E2 – triitiumiga radiomärgistatud 17β-östradiool.

Analüüsipuhver – 10 mM Tris, veise seerumi albumiin kontsentratsioonis 10 mg/ml, 2 mM DTT, 10 % glütserooli, 0,2 mM leupeptiin, pH 7,5.

Analüüsitsükkel – mikrotiiterplaadi katsekannude täieliku komplekti üheaegne analüüs, mille tulemusena saadakse kogu vajalik teave uuritava kemikaali ja hr-α-ERi omavahelise seondumise iseloomustamiseks (nimelt katsekannu lisatud [^{3}H]17β-östradiooli üldkogus, [^{3}H]17β-östradiooli maksimaalne seondumismäär hr-α-ERiga seondumisel, mittespetsiifilise seondumise määr ja summaarse seondumise määr uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel). Analüüsitsüklis võidakse igal kontsentratsioonil kasutada ka ainult ühte katsekannu (st paralleeli), ent kuna käesolevas katse-eeskirjas nõutakse kolme paralleelproovi kasutamist, analüüsitakse käesoleval juhul ühes analüüsitsüklis iga kontsentratsiooni puhul kolme katsekannu. Peale selle viiakse käesoleva katse-eeskirja kohaselt iga kemikaaliga läbi kolm iseseisvat (st järjestikust) analüüsitsüklit.

DCC – dekstraaniga kaetud süsi.

E2 – märgistamata 17β-östradiool (inertne).

hr-α-ER – rekombinantne inimese α-östrogeeniretseptor.

Paralleelproov – üks mitmest kannust, mis sisaldavad samu koostisaineid samas kontsentratsioonis ning mida analüüsitakse üheaegselt samas analüüsitsüklis. Käesoleva katse-eeskirja puhul analüüsitakse uuritavat kemikaali igal kontsentratsioonil kolmes paralleelis, st igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil analüüsitakse üheaegselt kolme paralleelproovi.

▼**M8**

Liide 2.2

TAVAPÄRANE [^{3}H]17β-ÖSTRADIOOLIGA KÜLLASTAMISE KATSE KOLME PARALLEELKANNUGA

Tavapärane [^{3}H]17β-östradiooliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga											
Asukoht	**Paralleelproov**	**Kannuliigi kood**	**Radioaktiivse E2 algkontsentratsioon (nM)**	**Radioaktiivse E2 kogus (µl)**	**Radioaktiivse E2 lõppkontsentratsioon (nM)**	**Märgistamata E2 algkontsentratsioon (µM)**	**Märgistamata E2 kogus (µl)**	**Märgistamata E2 lõppkontsentratsioon (µM)**	**Puhvri kogus (µl)**	**Retseptori kogus (µl)**	**Üldkogus kannus (µl)**
A1	1	R	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	R	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	R	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	R	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	R	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	R	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	R	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	R	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	R	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	R	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	R	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	R	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	R	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	R	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	R	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	R	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	R	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	R	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	R	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	R	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼**M8**

Tavapärane [^{3}H]17β-östradiooliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga

Asukoht	Paralleelproov	Kannuliigi kood	Radioaktiivse E2 algkontsentratsioon (nM)	Radioaktiivse E2 kogus (µl)	Radioaktiivse E2 lõppkontsentratsioon (nM)	Märgistamata E2 algkontsentratsioon (µM)	Märgistamata E2 kogus (µl)	Märgistamata E2 lõppkontsentratsioon (µM)	Puhvri kogus (µl)	Retseptori kogus (µl)	Üldkogus kannus (µl)
B9	3	R	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	R	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	R	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	R	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	RM	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	RM	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	RM	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	RM	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	RM	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	RM	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	RM	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	RM	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	RM	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	RM	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	RM	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	RM	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	RM	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	RM	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	RM	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	RM	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	RM	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	RM	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼**M8**

Tavapärane [^{3}H]17β-östradiooliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga											
Asukoht	**Paralleelproov**	**Kannuliigi kood**	**Radioaktiivse E2 algkontsentratsioon (nM)**	**Radioaktiivse E2 kogus (µl)**	**Radioaktiivse E2 lõppkontsentratsioon (nM)**	**Märgistamata E2 algkontsentratsioon (µM)**	**Märgistamata E2 kogus (µl)**	**Märgistamata E2 lõppkontsentratsioon (µM)**	**Puhvri kogus (µl)**	**Retseptori kogus (µl)**	**Üldkogus kannus (µl)**
E7	1	RM	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	RM	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	RM	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	RM	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	RM	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	RM	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Radiomärgis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Radiomärgis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Radiomärgis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Radiomärgis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Radiomärgis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Radiomärgis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Radiomärgis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Radiomärgis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Radiomärgis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Radiomärgis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Radiomärgis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Radiomärgis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Tavapärane [^{3}H]17β-östradiooliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga

Asukoht	Paralleelproov	Kannuliigi kood	Radioaktiivse E2 algkontsentratsioon (nM)	Radioaktiivse E2 kogus (µl)	Radioaktiivse E2 lõppkontsentratsioon (nM)	Märgistamata E2 algkontsentratsioon (µM)	Märgistamata E2 kogus (µl)	Märgistamata E2 lõppkontsentratsioon (µM)	Puhvri kogus (µl)	Retseptori kogus (µl)	Üldkogus kannus (µl)
H1	1	Radiomärgis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Radiomärgis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Radiomärgis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Radiomärgis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Radiomärgis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Radiomärgis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Radiomärgis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Radiomärgis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Radiomärgis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Radiomärgis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Radiomärgis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Radiomärgis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Tuleb silmas pidada, et kannud tähisega „Radiomärgis“ on inkubeerimise ajal tühjad. Ettenähtud 40 µl lisatakse ainult stsintillatsioonide loendamiseks.

▼**M8**

Liide 2.3

KONKUREERIVA SEONDUMISE KATSES KASUTATAV MIKROTIITERPLAADI SKEEM

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	A1	1	Summaarne seondumine	SS	SS1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	Summaarne seondumine	SS	SS2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	Summaarne seondumine	SS	SS3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	Summaarne seondumine	SS	SS4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	Summaarne seondumine	SS	SS5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	Summaarne seondumine	SS	SS6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	Märgistamata E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	Märgistamata E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	Märgistamata E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	Märgistamata E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrER põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	B5	2	Märgistamata E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	Märgistamata E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	Märgistamata E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	Märgistamata E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	Märgistamata E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	Märgistamata E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	Märgistamata E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	Märgistamata E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	Märgistamata E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	Märgistamata E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	Märgistamata E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	Märgistamata E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	Märgistamata E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	Märgistamata E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	Märgistamata E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	Märgistamata E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	C9	3	Märgistamata E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	Tühiproov	Tühipr-oov	T1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	Tühiproov	Tühipr-oov	T2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	Tühiproov	Tühipr-oov	T3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	Noretünodreel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	Noretünodreel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	Noretünodreel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	Noretünodreel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	Noretünodreel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	Noretünodreel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	Noretünodreel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	Noretünodreel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	Noretünodreel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	Noretünodreel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	Noretünodreel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	Noretünodreel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	Noretünodreel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	Noretünodreel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	Noretünodreel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	E8	2	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Puhvrikontr-oll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Puhvrikontr-oll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Puhvrikontr-oll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Puhvrikontr-oll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Puhvrikontr-oll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Puhvrikontr-oll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—

Tuleb silmas pidada, et kannud tähisega „Radiomärgis“ on inkubeerimise ajal tühjad. Ettenähtud 40 µl lisatakse ainult stsintillatsioonide loendamiseks.

▼M8

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	A1	1	Summaarne seondumine	SS	SS1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	Summaarne seondumine	SS	SS2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	Summaarne seondumine	SS	SS3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	Summaarne seondumine	SS	SS4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	Summaarne seondumine	SS	SS5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	Summaarne seondumine	SS	SS6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	C1	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	E1	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼**M8**

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	G1	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	Noretünodreel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretünodreel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretünodreel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretünodreel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretünodreel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretünodreel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	Märgistamata E2	S		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	Märgistamata E2	S		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	Märgistamata E2	S		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	Märgistamata E2	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	Märgistamata E2	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	Märgistamata E2	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

3. liide

LIGANDIGA SEONDUVAL REKOMBINANTSEL INIMESE α-ER-I VALGUDOMEENIL PÕHINEV JAAPANI KEMIKAALIDE HINDAMISE JA UURIMISE INSTITUUDI (CERI) *IN VITRO* MEETOD ÖSTROGEENIRETSEPTORIGA SEONDUMISE ANALÜÜSIMISEKS

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

1. Käesoleva östrogeeniretseptoril (α-ER) põhineva, küllastava ja konkureeriva seondumise analüüsimist võimaldava *in vitro* meetodi puhul kasutatakse inimese α-ERi (hr-α-ER) ligandiga seonduvat domeeni (LBD). See valgukonstrukt on toodetud Jaapani Kemikaalide Hindamise ja Uurimise Instituudis (CERI) ja seda ekspresseeritakse glutatiooni S-transferaasiga (GST) ühendatud liitvalguna bakteris *E. coli*. CERI katse-eeskirja on hinnatud rahvusvahelises mitme labori osalusel läbi viidud valideerimisuuringus (2), mille käigus tõendati, et see analüüsimeetod on kavandatud kasutuseesmärgi puhul asjakohane ja usaldusväärne.

2. Käesolev meetod on rakendatav sõeluuringu jaoks, mille eesmärk on tuvastada aineid, mis on võimelised seonduma hr-α-ERiga. Seda kasutatakse selleks, et hinnata uuritava kemikaali võimet konkureerida hr-α-ERi LBD-le seondumisel 17β-östradiooliga. Kvantitatiivsed katsetulemused võivad hõlmata uuritava kemikaali IC_{50} (uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis on vajalik poole [^{3}H]17β-östradiooli väljatõrjumiseks hr-α-ERilt) ja suhtelist seondumisafiinsust hr-α-ERi suhtes võrreldes 17β-östradiooliga. Kemikaalide sõeluuringu puhul võivad vastuvõetavad kvalitatiivsed katsetulemused hõlmata uuritavate kemikaalide liigitamist hr-α-ERiga seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks lähtuvalt seondumiskõverate suhtes kohaldatavatest kriteeriumidest.

3. Käesoleva analüüsimeetodi puhul kasutatakse radioaktiivset ligandi, mille jaoks peab laboril olema radioaktiivsete materjalide käitlemise luba. Kõikide radioisotoopide ja ohtlike kemikaalidega tehtavate toimingute puhul tuleks järgida siseriiklikes õigusaktides kirjeldatud eeskirju ja korda.

4. Enne käesoleva katsemeetodi kasutamist regulatiivsel eesmärgil tuleks lugeda peatükke „**ÜLDINE SISSEJUHATUS**“ ja „**hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID**“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

MEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

5. Inimese rekombinantse α-östrogeeniretseptoriga (hr-α-ER) seondumise analüüsimisel mõõdetakse radiomärgistatud ligandi ([^{3}H]17β-östradiool) võimet seonduda ERiga üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali (st konkureeriva ligandi) juuresolekul. Uuritavad kemikaalid, millel on ERi suhtes suur afiinsus, konkureerivad radiomärgistatud ligandiga väiksemal kontsentratsioonil kui kemikaalid, mille afiinsus retseptori suhtes on väiksem.

6. Kõnealune meetod hõlmab kahte põhielementi: küllastava seondumise katset, millega iseloomustatakse retseptor ja ligandi vahelise interaktsiooni parameetreid, ning sellele järgnevat konkureeriva seondumise katset, millega iseloomustatakse uuritava kemikaali ja radiomärgistatud ligandi vahelist konkurentsi ERile seondumisel.

▼M8

7. Küllastava seondumise katse eesmärk on teha konkureeriva seondumise katse eel kindlaks konkreetse partii retseptorite seondumisafiinsus ja arv. Küllastava seondumise katses mõõdetakse tasakaalutingimustes teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava östrogeeniretseptori afiinsust loodusliku ligandi suhtes (seda väljendab dissotsiatsioonikonstant K_d) ja retseptori aktiivsete seondumiskohtade kontsentratsiooni (B_{max}).

8. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse aine afiinsuse hindamiseks selle võimet konkureerida ERile seondumisel [^{3}H]17β-östradiooliga. Afiinsust väljendatakse uuritava kemikaali sellise kontsentratsiooni kaudu, mille juures kemikaal vähendab tasakaalutingimustes [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilist seondumist 50 % võrra (sellele vastab mõiste „50 % ulatuses inhibeeriv kontsentratsioon“ ehk IC_{50}). Afiinsust on võimalik hinnata ka suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) kaudu, mis määratakse samas analüüsitsüklis eraldi mõõdetud östradiooli IC_{50} suhtes. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava [^{3}H]17β-östradiooli seondumist laia vahemikku (kaheksat suurusjärku) hõlmavates kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Seejärel kohaldatakse saadud andmete suhtes võimaluse korral teatavat liiki Hilli võrrandit (Hill, 1910), millega kirjeldatakse radioligandi väljatõrjumist konkureeriva seonduva ainega, millel on üks seondumiskoht. Radiomärgistatud östradiooli väljatõrjumise ulatust tasakaalutingimustes kasutatakse uuritava kemikaali liigitamiseks seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks.

KATSE KÄIK

hr-α-ERi vastuvõetava funktsionaalsuse tõendamine

9. Enne küllastava seondumise ja konkureeriva seondumise katsete regulaarset kasutamist tuleks iga uue hr-α-ERi partii puhul tõendada selle nõuetekohast funktsionaalsust laboris, kus seda kasutama hakatakse. Funktsionaalsuse tõendamine peaks hõlmama kahte etappi. Need etapid on järgmised.

— Viiakse läbi [^{3}H]17β-östradiooli küllastava seondumise katse, et tõendada hr-α-ERi spetsiifilisust ja küllastumist. Nende andmete analüüsimisel mittelineaarse regressiooni teel (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja järgnevalt saadud Scatchardi graafiku alusel tuleks iga hr-α-ERi partii puhul dokumenteerida [^{3}H]17β-östradiooli seondumisafiinsus hr-α-ERi suhtes (K_d) ja retseptorite arv (B_{max}).

— Viiakse läbi konkureeriva seondumise katse kontrollainetega (võrdlusöstrogeen (17β-östradiool), nõrgalt seonduv aine (nt noretünodreel või noretindroon) ja mitteseonduv aine (oktüültrietoksüsilaan (OTES)). Igas laboris tuleks luua varasemate tulemuste andmebaas, et võimaldada dokumenteerida võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine IC_{50} ja muude asjakohaste näitajate väärtuste kooskõla määra eri katsete lõikes ja hr-α-ERi eri partiide puhul. Kontrollaineid iseloomustavate konkureeriva seondumise kõverate parameetrid peaksid jääma usaldusnivoole 95 % vastavasse usaldusvahemikku (vt tabel 1), mis tehti kindlaks kõnealuse analüüsimeetodi valideerimise uuringus osalenud laborites saadud andmete põhjal (2).

Tabel 1

CERI meetodi kohases hrERiga seondumise katses võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine puhul kohaldatavad tulemuslikkuse kriteeriumid

Aine	Näitaja	Keskmine [a]	Standardhälve (*n*)	Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % [b]	
				Alampiir	Ülempiir
17β-östradiool	Maksimumväärtus	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Miinimumväärtus	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Aine	Näitaja	Keskmine (a)	Standardhälve (*n*)	Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % (b)	
				Alampiir	Ülempiir
	Hilli tõus	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	Log IC_{50}	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretünodreel	Maksimumväärtus	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Miinimumväärtus	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hilli tõus	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	Log IC_{50}	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretindroon (c)	Maksimumväärtus	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Miinimumväärtus	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hilli tõus	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	Log IC_{50}	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

(a) Keskmine ± standardhälve (SD) koos valimi suurusega (*n*) on arvutatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparameetriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi valideerimisuuringu jooksul läbi neljas laboris (vt allikas 2, N lisa).

(b) Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on esitatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kehtestamise võimaldamiseks.

(c) Noretindrooni analüüsimine ei olnud valideerimisuuringus 4. alategevuse raames kohustuslik (vt allikas 2, 4. alategevus). Seega on keskmine ± SD (*n*) arvutatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparameetriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi läbi kahes laboris.

IC_{50} väärtuste vahemik sõltub konkreetses laboris kasutatava retseptoripreparaadi K_d väärtusest ja radiomärgistatud ligandi kontsentratsioonist. IC_{50} väärtuste vahemiku asjakohane kohandamine sõltuvalt katse läbiviimiseks kasutatud tingimustest on lubatud.

Labori pädevuse tõendamine

10. Tutvuge käesoleva katsemeetodi punktidega 17 ja 18 ning tabeliga 2 peatükis „**hrER–GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID**“. Iga katse (nii küllastava kui ka konkureeriva seondumise puhul) peaks koosnema kolmest eri päevadel läbi viidavast sõltumatust analüüsitsüklist (st kasutatakse retseptori, kemikaalide ja reaktiivide värskelt valmistatud lahjendusi) ja igas tsüklis tuleks kasutada kolme paralleelproovi.

Retseptori (hr-*α*-ER) kontsentratsiooni määramine

11. Aktiivse retseptori kontsentratsioon varieerub pisut eri partiide ja säilitustingimuste puhul. Seepärast tuleks määrata tarnijalt saadud aktiivse retseptori kontsentratsioon. See võimaldab kasutada katses sobivat aktiivse retseptori kontsentratsiooni.

12. Retseptorit tuleks konkureerivale seonduvale vastavates tingimustes (st 0,5 nM [^{3}H]östradiool) inkubeerida nominaalsel kontsentratsioonil 0,1, 0,2, 0,4 ja 0,6 nM ilma märgistamata östradioolita (summaarne seondumine) ja koos 1 µM märgistamata östradiooliga (mittespetsiifiline seondumine). Spetsiifiline seondumine, mis arvutatakse summaarse ja mittespetsiifilise seondumise

▼M8

vahena, esitatakse graafikul vastavuses retseptori nominaalse kontsentratsiooniga. Retseptori kontsentratsioon, mille puhul spetsiifilise seondumise määr vastab 40 protsendile lisatud radiomärgise kogusest, on seotud retseptori vastava nominaalse kontsentratsiooniga ja seda retseptori kontsentratsiooni tuleks kasutada küllastava ja konkureeriva seondumise katsetes. Sageli vastab neile tingimustele hrERi lõppkontsentratsioon 0,2 nM.

13. Kui 40 % kriteeriumi täitmine korduvalt ebaõnnestub, tuleks kontrollida katseplaani võimalike vigade suhtes. Suutmatus saavutada vastavust 40 % kriteeriumile võib viidata sellele, et rekombinantse valgu partiis on väga vähe aktiivset retseptorit, ning sel juhul tuleks kaaluda mõne muu retseptoripartii kasutamist.

Küllastava seondumise katse

14. [^{3}H]17β-östradiooli tuleks hindamiseks kasutada kaheksas eri kontsentratsioonis, iga kontsentratsiooni puhul kolmes paralleelis, ning kohaldada seejuures järgmist kolme tingimust (vt tabel 2).

a. Seondumine märgistamata 17β-östradiooli puudumisel ja ERi juuresolekul. Nii määratakse summaarne seondumine, mida väljendab radioaktiivsus kannudes, kus on ainult [^{3}H]17β-östradiool.

b. Seondumine märgistamata 17β-östradiooli juuresolekul 2000-kordses liias, võrreldes radiomärgistatud 17β-östradiooliga, ning ERi juuresolekuga. Nende tingimuse puhul on eesmärk küllastada aktiivsed seondumiskohad märgistamata 17β-östradiooliga ja määrata kannudes radioaktiivsuse mõõtmise teel mittespetsiifiline seondumine. Radioaktiivse östradiooli mis tahes kogus, mis on veel võimeline retseptoriga seonduma, loetakse olevat seondunud mittespetsiifiliselt, sest märgistamata östradiooli kontsentratsioon peaks olema nii suur, et kõik saadaolevad spetsiifilise seondumise kohad retseptoril on hõivatud.

c. Seondumine märgistamata 17β-östradiooli puudumisel ja ERi puudumisel (summaarse radioaktiivsuse määramine).

[^{3}H]17β-östradiooli, märgistamata 17β-östradiooli ja hr-α-ERi lahuste valmistamine

15. [^{3}H]17β-östradiooli 1 µM põhilahusest tuleks valmistada [^{3}H]17β-östradiooli 40 nM lahus DMSOs; selleks lisatakse toatemperatuuril DMSOd (et saada 200 nM lahus) ja analüüsipuhvrit (et saada 40 nM lahus). Saadud 40 nM lahusest valmistatakse toatemperatuuril analüüsipuhvri lisamise teel rida [^{3}H]17β-östradiooli lahjendusi kontsentratsiooniga 0,313 nM kuni 40 nM (nagu on kirjeldatud tabeli 2 kaheteistkümnendas veerus). Lõplik katsekontsentratsioon vahemikus 0,0313–4,0 nM saavutatakse 10 µl sellise lahuse lisamisega 96-kannulise mikrotiiterplaadi vastavasse katsekannu (vt tabelid 2 ja 3). Analüüsipuhvri valmistamist, eriaktiivsusel põhinevat [^{3}H]17β-östradiooli algse põhilahuse kontsentratsiooni arvutamist, lahjenduste valmistamist ning kontsentratsiooni määramist on põhjalikult kirjeldatud CERI katse-eeskirjas (2).

16. Märgistamata 17β-östradiooli lahuse lahjenduste valmistamiseks tuleks kasutada 17β-östradiooli 1 nM põhilahust, millele lisatakse analüüsipuhvrit, et saada kaheksa eri kontsentratsioonidega lahust, mille kontsentratsioon jääb algselt vahemikku 0,625 µM kuni 80 µM. Lõplik katsekontsentratsioon vahemikus 0,0625–8 µM saavutatakse 10 µl sellise lahuse lisamisega 96-kannulise mikrotiiterplaadi vastavasse katsekannu, mis on ette nähtud mittespetsiifilise seondumise mõõtmiseks (vt tabelid 2 ja 3). Märgistamata 17β-östradiooli lahjenduste valmistamist on põhjalikult kirjeldatud CERI katse-eeskirjas (2).

▼**M8**

17. Tuleks kasutada retseptori sellist kontsentratsiooni, mille puhul spetsiifiline seondumine on 40 ± 10 % (vt punktid 12–13). hr-α-ERi lahus tuleks valmistada jääkülma analüüsipuhvri lisamise teel vahetult enne kasutamist, st pärast seda, kui kõik summaarse seondumise, mittespetsiifilise seondumise ja ainult radioaktiivse ligandi määramiseks ette nähtud kannud on katseks ette valmistatud.

18. 96-kannulised mikrotiiterplaadid valmistatakse ette vastavalt tabelis 2 esitatud skeemile, kus [^{3}H]17β-östradiooli iga kontsentratsiooni puhul kasutatakse kolme paralleelproovi. Kasutatavad [^{3}H]17β-östradiooli, märgistamata 17β-östradiooli, puhvri ja retseptori kogused on esitatud tabelis 3.

Tabel 2

Küllastava seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	SSi mõõtmiseks			MSSi mõõtmiseks			Ainult radioaktiivse ligandi määramiseks				Märgistamata E2 lahjendused plaadi 4.–6. tulba jaoks	[^{3}H]E2 lahjendused plaadi 1.–9. tulba jaoks
A	0,0313 nM [^{3}H]E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H]E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H]E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H]E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H]E2+ ER			0,125 nM [^{3}H]E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H]E2+ ER			0,250 nM [^{3}H]E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3}H]E2+ ER			0,50 nM [^{3}H]E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H]E2+ ER			1,00 nM [^{3}H]E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H]E2+ ER			2,00 nM [^{3}H]E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H]E2+ ER			4,00 nM [^{3}H]E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

SS- summaarne seondumine
MSS- mittespetsiifiline seondumine
[^{3}H]E2- [^{3}H]17β-östradiool
E2- märgistamata 17β-östradiool
(*) Siin on esitatud lõppkontsentratsioon igas kannus.
(**) Märgistamata E2 ja [^{3}H]E2 lahjendused võib valmistada ka eraldi plaadil.

▼**M8**

Tabel 3

Reaktiivide kogused küllastamiskatses kasutataval mikrotiiterplaadil

Tulba number		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Katseetapid		SSi kannud			MSSi kannud			Ainult radioaktiivne ligand		
Eespool kirjeldatud reaktsioonikannudesse lisatavate komponentide kogused ja lisamise järjekord	Puhver	60 µl			50 µl			90 µl		
	Märgistamata E2 tabeli 2 üheteistkümnendast veerust	–			10 µl			–		
	[^{3}H]E2 tabeli 2 kaheteistkümnendast veerust	10 µl			10 µl			10 µl		
	hr-α-ER	30 µl			30 µl			—		
Reaktsiooni koguruumala		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubeerimine		**PÄRAST 2 TUNNI PIKKUST INKUBEERIMIST**						Radioaktiivsuse kvantifitseerimine kohe pärast lahuse valmistamist; inkubeerimist ei toimu		
Töötlus 0,4 % DCCga		Jah			Jah			**Ei**		
0,4 % DCC kogus		100 µl			100 µl			–		
Filtrimine		Jah			Jah			Ei		
RADIOAKTIIVSUSE MÕÕTMINE DPM-DES										
Stsintillatsioonikokteilile kvantifitseerimiseks lisatav kogus		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Kui radioaktiivsuse mõõtmiseks dpm-des kasutatakse mikrotiiterplaatide jaoks ette nähtud vedelikstsintillatsiooniloendurit, ei ole ainult radioaktiivset ligandi sisaldava proovi lisamine SSi ja MSSi kanne sisaldavale katseplaadile asjakohane. Ainult radioaktiivset ligandi sisaldav proov tuleks sel juhul valmistada eraldi plaadil.

(**) Kui DCC eraldamiseks kasutatakse tsentrifuugimist, tuleks vedelikstsintillatsiooniloenduriga mõõtmiseks kasutada 50 µl supernatanti, et hoida ära DCCga saastumist.

19. Summaarse seondumise ja mittespetsiifilise seondumise määramiseks kasutatavaid mikrotiiterplaate tuleks inkubeerida toatemperatuuril (22–28 °C) kaks tundi.

hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiooli mõõtmine

20. Pärast kahetunnist inkubatsiooniperioodi tuleks hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiooli eraldamiseks vabast [^{3}H]17β-östradioolist lisada kannudesse 100 µl jääkülma 0,4 % DCC suspensiooni. Seejärel tuleks plaadid asetada 10 minutiks jääle ning DCC eraldamiseks tuleks reaktsioonisegu ja DCC suspensioon kanda filtrimiseks mikrotiiterplaadifiltrile. Järgnevalt tuleks 100 µl filtraati lisada vedelikstsintillatsiooniloenduri viaalis olevale stsintillatsioonivedelikule, et määrata vedelikstsintillatsiooniloenduri abil igas viaalis lagunemiste arv minutis (dpm).

▼M8

21. Kui mikrotiiterplaadifilter ei ole kättesaadav, võib DCC eemaldamiseks kasutada tsentrifuugimist. Seejärel tuleks DCC puudutamisest tuleneda võiva kannude saastumise ärahoidmiseks väga ettevaatlikult võtta 50 µl supernatanti, mis sisaldab hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiooli, ning kasutada seda stsintillatsioonide loendamiseks.

22. Ainult radioaktiivset ligandi sisaldavaid proove kasutatakse selleks, et määrata katsekannudesse lisatud [^{3}H]17β-östradioolis toimuvate lagunemiste arv minutis (dpm). Radioaktiivsus tuleks kvantifitseerida vahetult pärast proovide valmistamist. Kõnealuseid kanne ei tohiks inkubeerida ega töödelda DCC suspensiooniga, vaid nende sisu tuleks lisada otse stsintillatsioonivedelikku. Saadavatest mõõtmistulemustest nähtub, kui palju [^{3}H]17β-östradiooli lisati dpm-des iga rühma kannudesse summaarse seondumise ja mittespetsiifilise seondumise hindamiseks.

Konkureeriva seondumise katse

23. Konkureeriva seondumise katse käigus mõõdetakse ühel kontsentratsioonil kasutatava [^{3}H]17β-östradiooli seondumist üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Igas analüüsitsüklis tuleks iga kontsentratsiooni puhul kasutada üheaegselt kolme paralleelproovi. Lisaks tuleks iga uuritava kemikaaliga läbi viia kolm järjestikust analüüsitsüklit. Katse läbiviimiseks tuleks kasutada ühte või mitut 96-kannulist mikrotiiterplaati.

Kontrollid

24. Katse läbiviimisel tuleks igas analüüsitsüklis kasutada paralleelset lahustiga kontrolli ja teisi kontrolle (st võrdlusöstrogeeni, nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet). Igas analüüsitsüklis tuleks ühel plaadil kasutada võrdlusöstrogeeni ja kontrollaineid (st nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet) täieliku kontsentratsioonikõvera ulatuses. Kõikidele ülejäänud plaatidele tuleks kanda i) E2 ja nõrgalt seonduv aine suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas, st radiomärgistatud ligandi praktiliselt täielikuks väljatõrjumiseks vajalikus) ja keskmises (umbes IC_{50}-le vastavas) kontsentratsioonis kolmes paralleelis ning ii) lahustiga kontroll ja mittespetsiifilise seondumise kontroll, kumbki kolmes paralleelis. Analüüsipuhvri, [^{3}H]17β-östradiooli, hr-α-ERi ja uuritava kemikaali lahuste valmistamist on põhjalikult kirjeldatud CERI katse-eeskirjas (2).

Lahustiga kontroll

25. Lahustiga kontroll võimaldab tõendada, et lahusti ei mõjuta katsesüsteemi, ja ühtlasi mõõta summaarset seondumist (SS). Eelistatud lahusti on DMSO. Kui uuritav kemikaal on suurimal kontsentratsioonil DMSOs mittelahustuv, võib lahustina kasutada etanooli. DMSO lõppkontsentratsioon katsekannudes peaks olema 2,05 %; kui uuritav kemikaal on vähelahustuv, võib DMSO sisaldust suurendada kuni 2,5 protsendini. DMSOd ei tohiks kasutada kontsentratsioonis üle 2,5 %, sest suuremal kontsentratsioonil hakkab lahusti mõjutama katsetulemusi. Kui uuritav kemikaal ei ole DMSOs lahustuv, kuid lahustub etanoolis, võib katses kasutada etanooli maksimaalses kontsentratsioonis 2 %, ilma et see mõjutaks katsetulemusi.

Puhvrikontroll

26. Puhvrikontroll (PK) ei tohiks sisaldada lahustit ega uuritavat kemikaali, kuid peaks sisaldama kõiki teisi analüüsikomponente. Puhvrikontrolliga saadud tulemusi võrreldakse lahustiga kontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta analüüsisüsteemi.

▼**M8**

Tugevalt seonduv aine (võrdlusöstrogeen)

27. 17β-östradiool (CASi nr: 50-28-2) on ERi endogeenne ligand ja seondub retseptori α-vormiga suure afiinsusega. Igas hr-α-ERiga tehtavas konkureeriva seondumise katses tuleks kasutada märgistamata 17β-östradiooli standardkõverat, et oleks võimalik hinnata katsetulemuste varieeruvust samas laboris pikema aja jooksul. DMSOs ja analüüsipuhvris tuleks valmistada kaheksa märgistamata 17β-östradiooli lahust; lõppkontsentratsioonid standardkõverate saamiseks kasutatavates katsekannudes on järgmised: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Märgistamata 17β-östradiooli suurimat kontsentratsiooni (1 μM) kasutatakse ka mittespetsiifilise seondumise hindamiseks. See kontsentratsioon on tabelis 4 tähistatud märgisega „MSS“, kuigi see on samuti osa standardkõverast.

Nõrgalt seonduv aine

28. Igas analüüsitsüklis tuleks tundlikkuse tõendamiseks ja pikema aja jooksul saadud tulemuste varieeruvuse hindamiseks kasutada ka nõrgalt seonduvat ainet (noretünodreeli (CASi nr: 68-23-5) või noretindrooni (CASi nr: 68-22-4)). Nõrgalt seonduvast ainest tuleks valmistada DMSOs ja analüüsipuhvris kaheksa lahust; katsekannudes kasutatavad lõppkontsentratsioonid on järgmised: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} ja 10^{-9} M.

Mitteseonduv aine

29. Negatiivse kontrollina (mitteseonduva ainena) tuleks kasutada oktüültrietoksüsilaani (OTES; CASi nr: 2943-75-1). Sellega tagatakse, et katse käigus on võimalik tuvastada hr-α-ERiga mitteseonduvaid uuritavaid kemikaale. Mitteseonduvast ainest tuleks valmistada DMSOs ja analüüsipuhvris kaheksa lahust; katsekannudes kasutatavad lõppkontsentratsioonid on järgmised: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Alternatiivse mitteseonduva ainena võib kasutada di-*n*-butüülftalaati (DBP; CASi nr: 84-72-2), ent seda võib analüüsida üksnes kontsentratsioonini 10^{-4} M. DBP maksimaalne lahustuvus katsetingimustes on teadaolevalt 10^{-4} M.

hr-α-ERi kontsentratsioon

30. Tuleks kasutada sellist retseptori kogust, mille puhul spetsiifiline seondumine on 40 ± 10 % (vt 3. liite punktid 12–13). hr-α-ERi lahus, mis saadakse funktsionaalse hr-α-ERi lahjendamisel jääkülmas analüüsipuhvris, tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

[^{3}H]17β-östradiool

31. [^{3}H]17β-östradiooli lõppkontsentratsioon katsekannudes peaks olema 0,5 nM.

Uuritavad kemikaalid

32. Iga uuritava kemikaali puhul on esmalt vaja läbi viia lahustuvuskatse, et määrata lahustuvuspiir ja teha kindlaks katse-eeskirja järgimiseks sobiv kontsentratsioonivahemik. Iga uuritava kemikaali lahustuvuspiir tuleb algselt määrata lahustis ja seejärel kontrollida seda katsetingimustes. Katses kasutatav lõppkontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 1 mM. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kasutatakse lahustiga kontrolli koos vähemalt kaheksa järjestikuse üksteisest log-ühiku võrra erineva lahjendusega, mille puhul alustatakse maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM või väiksem, olenevalt lahustuvuspiirist), ja registreeritakse nähtava hägu või sademe tekkimine (vt ka 3. liite punkt 35). Kui katse jaoks sobiv kontsentratsioonivahemik on kindlaks tehtud, tuleks uuritavat kemikaali analüüsida eelnevas kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kindlaks tehtud kaheksal

▼M8

üksteisest log-ühiku võrra erineval kontsentratsioonil. Teises ja kolmandas katses tuleks kontsentratsioone vajaduse korral kohandada, et kontsentratsioonist sõltuvuse kõverat oleks võimalik paremini iseloomustada.

33. Uuritava kemikaali lahjendused tuleks valmistada sobivas lahustis (vt 3. liite punkt 25). Kui uuritava kemikaal ei lahustu suurimal kontsentratsioonil DMSOs ega etanoolis ja suurema koguse lahusti lisamisel tõuseks lahusti sisaldus lõpplahuses üle lubatud piirmäära, võib suurima kontsentratsioonina kasutada lahjenduste reas järgmist väiksemat kontsentratsiooni. Sellisel juhul võib lisada kontsentratsioonirea lahjemasse otsa ühe lisalahjenduse. Teised kontsentratsioonid lahjenduste reas tuleks jätta muutmata.

34. Uuritava kemikaali lahuseid tuleks pärast katsekannu lisamist hoolikalt jälgida, sest uuritav kemikaal võib kannu lisamisel välja sadeneda. Kõigi sadet sisaldavate kannude andmed tuleks kõvera lähendamisel välja jätta ja registreerida andmete väljajätmise põhjus.

35. Kui eelnevalt on olemas muudest allikatest pärinev teave uuritava kemikaali log IC_{50} kohta, võib olla asjakohane kasutada lahjenduste geomeetrilist väiksema sammuga jaotust eeldatava log IC_{50} ümber (nt sammuga 0,5 log-ühikut). Lõpptulemuses peaks kajastuma piisav kontsentratsioonide ulatus kummalgi pool log IC_{50} väärtust, sealhulgas kõvera ülemine ja alumine osa, nii et seondumiskõverat oleks võimalik piisavalt iseloomustada.

Katseplaatide kasutusskeemid

36. Tähistatud mikrotiiterplaatide ettevalmistamisel tuleks lähtuda sellest, et katses kasutatakse lahustiga kontrolli, võrdlusöstrogeeni (E2) suurimat kontsentratsiooni – selle abil hinnatakse ühtlasi mittespetsiifilist seondumist (MSS) – ja puhvrikontrolli kuues paralleelis ning mitteseonduva kontrollaine (oktüültrietoksüsilaani) kaheksat kontsentratsiooni, võrdlusöstrogeeni (E2) seitset väiksemat kontsentratsiooni, nõrgalt seonduva aine (noretünodreeli või noretindrooni) kaheksat kontsentratsiooni ja iga uuritava kemikaali (UK) kaheksat kontsentratsiooni kolmes paralleelis. Võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid hõlmav plaadi näidisskeem on esitatud tabelis 4. Uuritavate kemikaalide analüüsimiseks kasutatakse eraldi mikrotiiterplaate, mis peaksid sisaldama ka järgmisi plaadikontrolle: i) E2 ja nõrgalt seonduvat ainet suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas) ja keskmises (umbes IC_{50}-le vastavas) kontsentratsioonis, kõikidel juhtudel kolmes paralleelis; ii) lahustiga kontrolli (summaarse seondumise hindamiseks) ja mittespetsiifilise seondumise kontrolli, kummalgi juhul kuues paralleelis (tabel 5). Konkureeriva seondumise katses kasutatavale mikrotiiterplaadi skeemile vastav näidistööleht kolme tundmatu uuritava kemikaali analüüsimiseks on esitatud liites 3.3. Töölehel ning tabelites 4 ja 5 on esitatud igas katsekannus kasutatavad lõppkontsentratsioonid. E2 maksimaalne kontsentratsioon peaks olema 1×10^{-7} M ja nõrgalt seonduva aine puhul tuleks kasutada 1. plaadil kasutatud suurimat kontsentratsiooni. IC_{50} tuleb laboris määrata kontrollidega varem saadud tulemuste andmebaasi alusel. Eeldatavalt on see väärtus sarnane valideerimisuuringutes täheldatud väärtusega (vt tabel 1).

▼**M8**

Tabel 4

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem (1), (2), mis hõlmab võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid (1. plaat)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Puhvrikontroll ja positiivne kontroll (E2)			Nõrgalt positiivne aine (noretünodreel)			Negatiivne kontroll (OTES)			SS ja MSS		
A	Tühi kann (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			SS (lahustiga kontroll) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			MSS (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Puhvrikontroll		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Tühiproov (radiomärgise jaoks) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

(1) Proovide skeem standardeid sisaldaval mikrotiiterplaadil, mida tuleb kasutada igas analüüsitsüklis.
(2) Tuleb silmas pidada, et sellel mikrotiiterplaadil olevate proovide jaoks kasutatakse lahjendusplaadil valmistatud eespool kirjeldatud standardite lahjendusi.
Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).
(*) Täiesti tühi kasutamata kann.
(**) Tühiproov, mida ei kasutata inkubeerimise ajal, kuid mida kasutatakse lisatud radiomärgise summaarse radioaktiivsuse kontrollimiseks.

Tabel 5

Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem uuritavaid kemikaale (UK) ja plaadikontrolle sisaldavate ülejäänud plaatide jaoks

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Uuritav kemikaal nr 1 (UK-1)			Uuritav kemikaal nr 2 (UK-2)			Uuritav kemikaal nr 3 (UK-3)			Kontrollid		
A	UK-1 (1×10^{-10} M)			UK-2 (1×10^{-10} M)			UK-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	UK-1 (1×10^{-9} M)			UK-2 (1×10^{-9} M)			UK-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	UK-1 (1×10^{-8} M)			UK-2 (1×10^{-8} M)			UK-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	UK-1 (1×10^{-7} M)			UK-2 (1×10^{-7} M)			UK-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	UK-1 (1×10^{-6} M)			UK-2 (1×10^{-6} M)			UK-3 (1×10^{-6} M)			MSS (10^{-6} M E2)		
F	UK-1 (1×10^{-5} M)			UK-2 (1×10^{-5} M)			UK-3 (1×10^{-5} M)					
G	UK-1 (1×10^{-4} M)			UK-2 (1×10^{-4} M)			UK-3 (1×10^{-4} M)			SS (lahustiga kontroll)		
H	UK-1 (1×10^{-3} M)			UK-2 (1×10^{-3} M)			UK-3 (1×10^{-3} M)					

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

▼M8

Konkureeriva seondumise katse lõpetamine

37. Nagu on näidatud tabelis 6, tuleks igasse kannu – välja arvatud summaarse seondumise ja tühiproovide (radiomärgise) analüüsimiseks ette nähtud kannud – lisada 50 µl analüüsipuhvrit ja seejärel 10 µl lahustiga kontrolli, võrdlusöstrogeeni (E2), nõrgalt seonduvat ainet, mitteseonduvat ainet või uuritavat kemikaali ning 10 µl 5 nM [^{3}H]17β-östradiooli lahust. Seejärel lisatakse igasse kannu 30 µl jääkülma retseptorilahust ja segatakse saadud lahust ettevaatlikult. hr-α-ERi lahus tuleks lisada viimasena. Katses kasutatavaid mikrotiiterplaate inkubeeritakse toatemperatuuril (22–28 °C) kaks tundi.

Tabel 6

hrERil põhineva konkureeriva seondumise katse komponentide kogused mikrotiiterplaadil

Ettevalmistusetapid		Muud kannud peale SSi kannude	SSi kannud	Tühiproov (radiomärgise jaoks)
Eespool kirjeldatud reaktsioonikannudesse lisatavate komponentide kogused ja lisamise järjekord	Toatemperatuuril analüüsipuhver	50 µl	60 µl	90 µl
	Märgistamata E2, nõrgalt seonduv aine, mitteseonduv aine, lahusti või uuritav kemikaal (*)	10 µl	—	—
	[^{3}H]17β-östradiool kontsentratsioonis, mille puhul saadav lõppkontsentratsioon on 0,5 nM (st 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Määratud kontsentratsiooniga hr-α-ERi lahus (vt punktid 12–13)	30 µl	30 µl	—
Lõppruumala igas katsekannus		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Nõuetekohaselt nii valmistatud, et saadava lõppkontsentratsiooni puhul jääb lahusti sisaldus vastuvõetavasse vahemikku.

38. Seejärel tuleks viia läbi hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiooli kvantifitseerimine pärast seda, kui hr-α-ERiga seondunud [^{3}H]17β-östradiool on eraldatud vabast [^{3}H]17β-östradioolist igasse kannu 100 µl jääkülma DCC suspensiooni lisamise teel, nagu on kirjeldatud küllastava seondumise katset käsitlevates 3. liite punktides 21–23.

39. Kannusid G10–G12 ja H10–H12 (tabelis 4 tähistatud kui tühiproovid (radiomärgise jaoks)) kasutatakse 10 µl [^{3}H]-ga märgistatud östradiooli radioaktiivsuse määramiseks dpm-des. 10 µl suurused alikvoodid tuleks lisada otse stsintillatsioonivedelikku.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Küllastava seondumise katse

40. Spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma [^{3}H]17β-östradiooli kontsentratsiooni suurenedes platoole; see viitab hr-α-ERi küllastumisele ligandiga.

41. Spetsiifiline seondumine [^{3}H]17β-östradiooli kontsentratsioonil 0,5 nM peaks jääma vastuvõetavasse vahemikku 30–50 % eri analüüsitsüklites mõõdetud, lisatud radiomärgise kogusele vastava summaarse radioaktiivsuse näitajate keskväärtusest. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüüsitsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüüsitsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugele, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada ja küllastamiskatset korrata.

▼M8

42. Andmed peaksid võimaldama saada lineaarse Scatchardi graafiku.

43. Mittespetsiifiline seondumine ei tohi olla liiga ulatuslik. Mittespetsiifilise seondumise määr on tavaliselt < 35 % summaarse seondumise määrast. See suhtarv võib siiski olla aeg-ajalt suurem, kui mõõdetakse väga väikest dpm-des väljendatavat radioaktiivsust radiomärgistatud 17β-östradiooli väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil.

Konkureeriva seondumise katse

44. Märgistamata 17β-östradiool peaks kontsentratsiooni suurenedes tõrjuma [^{3}H]17β-östradiooli retseptorilt välja viisil, mis vastab konkureerivale seondumisele ühes seondumiskohas.

45. Võrdlusöstrogeeni (st 17β-östradiooli) IC_{50} väärtus peaks olema ligikaudselt võrdne [^{3}H]17β-östradiooli molaarse kontsentratsiooni ja küllastava seondumise katses määratud K_d summaga.

46. Spetsiifiline seondumine peaks järjepidevalt olema vastuvõetavas vahemikus 40 ± 10 %, kui igas kannus täheldatavale summaarsele radioaktiivsusele vastav lisatud radiomärgise keskmine mõõdetud kontsentratsioon on eri analüüsitsüklite lõikes 0,5 nM. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüüsitsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüüsitsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugele, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada.

47. Lahusti ei tohiks mõjutada analüüsimeetodi tundlikkust ega tulemuste reprodutseeritavust. Lahustiga kontrolliga (SSi kannudega) saadud tulemusi võrreldakse puhvrikontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta katsesüsteemi. Kui lahustil puudub mõju katsetulemustele, peaksid SSi proove ja puhvrikontrolli iseloomustavad tulemused olema võrreldavad.

48. Mitteseonduv aine ei tohiks tõrjuda hr-α-ERilt välja rohkem kui 25 % [^{3}H]17β-östradioolist, kui sellist ainet analüüsitakse kontsentratsioonil kuni 10^{-3} M (OTES) või 10^{-4} M (DBP).

49. Tulemuslikkuse kriteeriumide väljatöötamiseks võrdlusöstrogeeni ja kahe nõrgalt seonduva aine (nt noretünodreeli ja noretindrooni) jaoks on kasutatud hrERiga seondumist analüüsida võimaldava CERI meetodi valideerimise uuringu andmeid (allikas 2, N lisa). Valideerimisuuringus osalenud neljas laboris tehtud kõikide kontrollkatsete tulemuste puhul on keskväärtuse ± SD (*n*) kõrval esitatud ka usaldusvahemik usaldusnivool 95 %. Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on arvutatud võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduvaid aineid iseloomustavate lähenduskõvera parameetrite (st maksimumi, miinimumi, Hilli tõusu, log IC_{50}) jaoks ning võrdlusöstrogeeni suhtes väljendatava nõrgalt seonduvate ainete $\log_{10}$ RBA jaoks. Tabelis 1 on esitatud tulemuslikkuse kriteeriumidena kasutatavate lähenduskõvera parameetrite eeldatavad väärtusevahemikud. Praktikas võib IC_{50} väärtuste vahemik retseptoripreparaadi katseliselt määratud K_d-st ja katses kasutatavast ligandi kontsentratsioonist sõltuvalt pisut varieeruda.

50. Uuritavate kemikaalide jaoks ei ole lähenduskõvera parameetreid käsitlevaid tulemuslikkuse kriteeriume kindlaks määratud, kuna olemasolevate võimalike uuritavate kemikaalide hulk on lai ning nende võimalik afiinsus ja saadavad tulemused varieeruvad (nt täielik kõver, osaline kõver, sobiva kõvera puudumine). Uuritava kemikaaliga igas analüüsitsüklis saadud tulemuste hindamisel tuleks siiski lähtuda eksperdihinnangust. Tuleks kasutada piisavalt suurt uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku, et konkureeriva seondumise

▼M8

kõvera ülemine osa (nt osa, kus seondumine on 90–100 %) selgelt välja joonistuks. Paralleelproovide vaheline varieeruvus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ja kolme järjestikuse analüüsitsükli vaheline varieeruvus peaks olema mõõdukas ja teaduslikult põhjendatav. Uuritava kemikaali hindamisel peaksid kontrollidega saadud tulemused igas analüüsitsüklis ligilähedaselt vastama CERI meetodit iseloomustavatele tulemusnäitajatele ja olema kooskõlas asjaomases laboris kontrollidega varem saadud tulemustega.

ANDMEANALÜÜS

Küllastava seondumise katse

51. Mõõdetakse nii summaarset kui ka mittespetsiifilist seondumist. Nende väärtuste põhjal arvutatakse üha suuremas kontsentratsioonis esineva [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilise seondumise näitaja tasakaalutingimustes; selleks lahutatakse summaarse seondumise näitajast mittespetsiifilise seondumise näitaja. [^{3}H]17β-östradiooli kontsentratsioonist sõltuva spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma platoole, kus [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine on hr-α-ERi küllastumisest tulenevalt maksimaalne. Lisaks peaks andmeanalüüsist nähtuma [^{3}H]17β-östradiooli seondumine ühteainsasse suure afiinsusega seondumiskohta. Küllastava seondumise graafikul peaks olema näidatud mittespetsiifiline, summaarne ja spetsiifiline seondumine. Järgnevas andmeanalüüsis tuleks kasutada mittelineaarset regressiooni (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja andmed tuleks lõplikul kujul esitada Scatchardi graafikul.

52. Andmeanalüüsi käigus tuleks määrata B_{max} ja K_d üksnes summaarse seondumise andmete põhjal ning lähtuda seejuures eeldusest, et mittespetsiifiline seondumine on lineaarne, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus teistsuguse meetodi kasutamise kohta. Lisaks tuleks parima lähenduskõvera leidmiseks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Tuleks märkida, millist robustse regressioonanalüüsi meetodit kasutatakse. Küllastava seondumise andmete alusel B_{max}-i ja K_d määramisel tuleks andmeid alati korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes (nt meetodi abil, mida on kirjeldanud Swillens (1995)).

Konkureeriva seondumise katse

53. Konkureeriva seondumise kõver esitatakse graafikul nii, et ühel teljel on [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine ja teisel konkureeriva aine kontsentratsioon (log_{10}-ühikutes). Uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine on 50 % maksimummäärast, on IC_{50} väärtus.

54. Positiivsete kontrollide (nt võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine) log IC_{50} hinnanguliste väärtuste kindlakstegemiseks tuleks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparameetrilist Hilli võrrandit (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Kõnealuste kõverate lähendamisel tuleks kõvera ülemine ja alumine osa, tõus ja log IC_{50} üldjuhul jätta piiritlemata. Parima lähenduskõvera leidmiseks tuleks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Andmeid ei tohiks korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes. Pärast esmast analüüsi tuleks iga seondumiskõver üle vaadata, et veenduda mudeli ja andmete omavahelises sobivuses. Nõrgalt seonduva aine suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) leidmiseks tuleks arvutada nõrgalt seonduva aine log IC_{50} väärtuse protsentuaalne osakaal 17β-östradiooli log IC_{50} väärtusest. Positiivsete kontrollidega ja mitteseonduval ainel põhineva kontrolliga saadud tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt käesoleva 3. liite punktide 44–49 kohastest katsemeetodi tulemuslikkuse näitajatest.

▼M8

55. Kõigi uuritavate kemikaalide andmete analüüsimisel tuleks kasutada astmelist lähenemist, et tagada andmete asjakohane analüüs ja kõigi konkureeriva seondumise kõverate nõuetekohane liigitamine. Soovitatavalt tuleks uuritava kemikaaliga läbi viidud iga analüüsitsükli puhul esmalt rakendada täpselt sama standardiseeritud andmeanalüüsi, mida kasutatakse võrdlusöstrogeenil ja nõrgalt seonduval ainel põhinevate kontrollide puhul (vt käesoleva 3. liite punkt 54). Pärast esmast analüüsi tuleks iga analüüsitsükli puhul teha lähenduskõvera parameetrite tehniline kontroll ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Tehnilise kontrolli käigus täheldatav kontsentratsioonist sõltuv [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilise seondumise protsentuaalse määra vähenemine, tehniliste paralleelproovide andmete vaheline väike varieeruvus kemikaali kõigil kontsentratsioonidel ja lähenduskõvera parameetrite sarnased väärtused kolmes analüüsitsüklis viitavad sellele, et katse ja andmeanalüüs on läbi viidud nõuetekohaselt.

Andmete tõlgendamine

56. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr-α-ERiga seonduvaks, kui seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jõõvale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on võiksem kui 50 % (joonis 1).

57. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on tõidetud, loetakse uuritav kemikaal hr-α-ERiga mitteseonduvaks, kui:

— seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on suurem kui 75 % või

— sobiv seondumiskõver puudub ja väikseim silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas on suurem kui 75 %.

58. Kui ükski eespool kirjeldatud tingimus ei ole täidetud (nt lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on vahemikus 75–50 %), liigitatakse uuritav kemikaal ebaselgeks.

Tabel 7

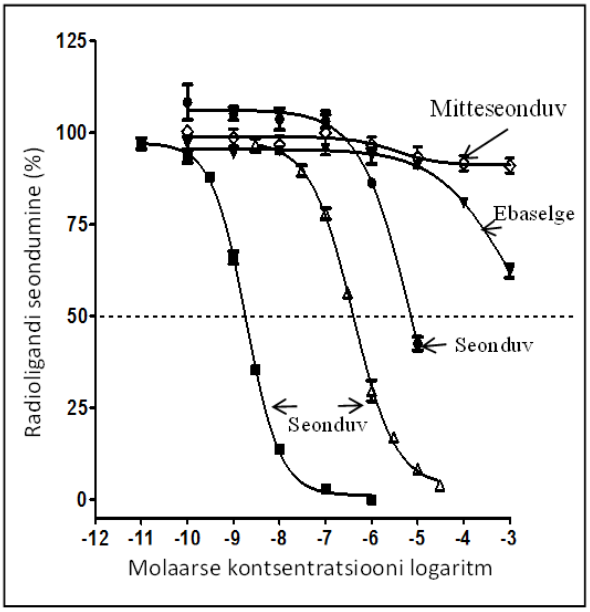
Uuritava kemikaali konkureeriva seondumise kõveral põhinevad liigitamiskriteeriumid

Liigitus	Kriteeriumid
Seonduv[a]	Seondumiskõver sobitub andmetega. **Katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 %.**
Mitteseonduv[b]	Seondumiskõvera sobitumisel andmetega on **katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus suurem kui 75 %**. Sobiva seondumiskõvera puudumisel on **väikseim silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas suurem kui 75 %**.
Ebaselge[c]	Ükskõik millises nõuetekohases analüüsitsüklis saadud tulemus, mille alusel ei saa uuritavat kemikaali liigitada seonduvaks aineks ega mitteseonduvaks aineks (näiteks vastab lähendatud sõltuvuskõvera madalaim punkt väärtusele 75–50 %).

▼M8

Joonis 1.

Näited uuritava kemikaali liigitamise kohta konkureeriva seondumise kõvera alusel



59. Samas laboris uuritava kemikaaliga läbi viidud mitme analüüsitsükli tulemuste kokkuvõtmiseks omistatakse iga analüüsitsükli tulemusele arvväärtus ja leitakse nende arvväärtuste keskmine, nagu on kirjeldatud tabelis 8. Igas laboris analüüsitsüklite tulemuste koondamisel saadud tulemust võrreldakse iga uuritava kemikaali puhul eeldatava liigitamistulemusega.

Tabel 8

Meetod uuritava kemikaali liigitamiseks samas laboris läbi viidud mitme analüüsitsükli alusel

Iga analüüsitsükli tulemusele väärtuse omistamine	
Liigitus	**Arvväärtus**
Seonduv	2
Ebaselge	1
Mitteseonduv	0
Liigitamine eri analüüsitsüklites saadud arvväärtuste keskmise alusel	
Liigitus	**Arvväärtus**
Seonduv	Keskmine ≥ 1,5
Ebaselge	0,5 ≤ keskmine < 1,5
Mitteseonduv	Keskmine < 0,5

KATSEPROTOKOLL

60. Vt käesoleva katsemeetodi punkt 24 peatükis „hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID“.

▼**M8**

Liide 3.1

MÕISTETE LOETELU

[^{3}H]E2 – triitiumiga radiomärgistatud 17β-östradiool.

Analüüsipuhver – 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM $NaVO_3$, 10 % glütserooli, 0,2 mM leupeptiin, 1 mM ditiotreitool ja veise seerumi albumiin kontsentratsioonis 10 mg/ml.

Analüüsitsükkel – mikrotiiterplaadi katsekannude täieliku komplekti üheaegne analüüs, mille tulemusena saadakse kogu vajalik teave uuritava kemikaali ja hr-α-ERi omavahelise seondumise iseloomustamiseks (nimelt katsekannu lisatud [^{3}H]17β-östradiooli üldkogus, [^{3}H]17β-östradiooli maksimaalne seondumismäär hr-α-ERiga seondumisel, mittespetsiifilise seondumise määr ja summaarse seondumise määr uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel). Analüüsitsüklis võidakse igal kontsentratsioonil kasutada ka ainult ühte katsekannu (st paralleeli), ent kuna käesolevas katse-eeskirjas nõutakse kolme paralleelproovi kasutamist, analüüsitakse käesoleval juhul ühes analüüsitsüklis iga kontsentratsiooni puhul kolme katsekannu. Peale selle viiakse käesoleva katse-eeskirja kohaselt iga kemikaaliga läbi kolm iseseisvat (st järjestikust) analüüsitsüklit.

DCC – dekstraaniga kaetud süsi.

E2 – märgistamata 17β-östradiool (inertne).

hr-α-ER – rekombinantne inimese α-östrogeeniretseptor (ligandiga seonduv domeen).

Paralleelproov – Üks mitmest kannust, mis sisaldavad samu koostisaineid samas kontsentratsioonis ning mida analüüsitakse üheaegselt samas analüüsitsüklis. Käesoleva katse-eeskirja puhul analüüsitakse uuritavat kemikaali igal kontsentratsioonil kolmes paralleelis, st igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil analüüsitakse üheaegselt kolme paralleelproovi.

▼**M8**

Liide 3.2

KONKUREERIVA SEONDUMISE KATSES KASUTATAV MIKROTIITERPLAADI SKEEM

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	A1	1	Tühi kann	TK	TK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Tühi kann	TK	TK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Tühi kann	TK	TK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	Märgistamata E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	Märgistamata E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	Märgistamata E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	Märgistamata E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	Märgistamata E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	Märgistamata E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	Märgistamata E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	Märgistamata E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	Märgistamata E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	Märgistamata E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	Märgistamata E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	Märgistamata E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	Märgistamata E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	Märgistamata E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	Märgistamata E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	Märgistamata E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkurceriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkurceriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	G2	2	Märgistamata E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	Märgistamata E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	Märgistamata E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	Märgistamata E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	Märgistamata E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	Noretünodreel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	Noretünodreel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	Noretünodreel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	Noretünodreel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	Noretünodreel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	Noretünodreel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	Noretünodreel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	Noretünodreel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	Noretünodreel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	Noretünodreel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	Noretünodreel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	Noretünodreel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	Noretünodreel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	Noretünodreel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	Noretünodreel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	F4	1	Noretünodreel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	Noretünodreel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	Noretünodreel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	Noretünodreel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	Noretünodreel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	Noretünodreel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	Noretünodreel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	Noretünodreel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	Noretünodreel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	Summaarne seondumine	SS	SS1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	Summaarne seondumine	SS	SS2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	Summaarne seondumine	SS	SS3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	Summaarne seondumine	SS	SS4	—	30	60	10	—	100	—
S	B11	5	Summaarne seondumine	SS	SS5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	Summaarne seondumine	SS	SS6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	D12	6	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Puhvrikontroll	PK	PK1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Puhvrikontroll	PK	PK2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Puhvrikontroll	PK	PK3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Puhvrikontroll	PK	PK4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Puhvrikontroll	PK	PK5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Puhvrikontroll	PK	PK6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-märgis	H1	—	90	—	10	—	100	—
S	G11 (*)	2	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-märgis	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-märgis	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-märgis	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	H11 (*)	5	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-märgis	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12*	6	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-märgis	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Tundmatu nr 1	T1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Tundmatu nr 1	T1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Tundmatu nr 1	T1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Tundmatu nr 1	T1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Tundmatu nr 1	T1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Tundmatu nr 1	T1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Tundmatu nr 1	T1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Tundmatu nr 1	T1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Tundmatu nr 1	T1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Tundmatu nr 1	T1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Tundmatu nr 1	T1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Tundmatu nr 1	T1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Tundmatu nr 1	T1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Tundmatu nr 1	T1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Tundmatu nr 1	T1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Tundmatu nr 1	T1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Tundmatu nr 1	T1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Tundmatu nr 1	T1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Tundmatu nr 1	T1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Tundmatu nr 1	T1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Tundmatu nr 1	T1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Tundmatu nr 1	T1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Tundmatu nr 1	T1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	H3	3	Tundmatu nr 1	T1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Tundmatu nr 2	T2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Tundmatu nr 2	T2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Tundmatu nr 2	T2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Tundmatu nr 2	T2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Tundmatu nr 2	T2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Tundmatu nr 2	T2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Tundmatu nr 2	T2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Tundmatu nr 2	T2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Tundmatu nr 2	T2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Tundmatu nr 2	T2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Tundmatu nr 2	T2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Tundmatu nr 2	T2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Tundmatu nr 2	T2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Tundmatu nr 2	T2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Tundmatu nr 2	T2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Tundmatu nr 2	T2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Tundmatu nr 2	T2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Tundmatu nr 2	T2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Tundmatu nr 2	T2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Tundmatu nr 2	T2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Tundmatu nr 2	T2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Tundmatu nr 2	T2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Tundmatu nr 2	T2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Tundmatu nr 2	T2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Tundmatu nr 3	T3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Tundmatu nr 3	T3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	A9	3	Tundmatu nr 3	T3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Tundmatu nr 3	T3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Tundmatu nr 3	T3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Tundmatu nr 3	T3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Tundmatu nr 3	T3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Tundmatu nr 3	T3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Tundmatu nr 3	T3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Tundmatu nr 3	T3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Tundmatu nr 3	T3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Tundmatu nr 3	T3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Tundmatu nr 3	T3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Tundmatu nr 3	T3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Tundmatu nr 3	T3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Tundmatu nr 3	T3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Tundmatu nr 3	T3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Tundmatu nr 3	T3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Tundmatu nr 3	T3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Tundmatu nr 3	T3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Tundmatu nr 3	T3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Tundmatu nr 3	T3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Tundmatu nr 3	T3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Tundmatu nr 3	T3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Kontroll: E2 (maks.)	S	E2maks1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Kontroll: E2 (maks.)	S	E2maks2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Kontroll: E2 (maks.)	S	E2maks3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Kontroll: E2 (IC_{50})	S	E2IC_{50}1	E2 IC_{50} × 10	30	50	10	10	100	E2 IC_{50}

▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	B11	2	Kontroll: E2 (IC_{50})	S	E2IC_{50}2	E2 IC_{50} × 10	30	50	10	10	100	E2 IC_{50}
P1	B12	3	Kontroll: E2 (IC_{50})	S	E2IC_{50}3	E2 IC_{50} × 10	30	50	10	10	100	E2 IC_{50}
P1	C10	1	Kontroll: NE (maks.)	S	NEmaks1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Kontroll: NE (maks.)	S	NEmaks2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Kontroll: NE (maks.)	S	NEmaks3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Kontroll: NE (IC_{50})	S	NEIC_{50}1	NE IC_{50} × 10	30	50	10	10	100	NE IC_{50}
P1	D11	2	Kontroll: NE (IC_{50})	S	NEIC_{50}2	NE IC_{50} × 10	30	50	10	10	100	NE IC_{50}
P1	D12	3	Kontroll: NE (IC_{50})	S	NEIC_{50}3	NE IC_{50} × 10	30	50	10	10	100	NE IC_{50}
P1	E10	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	Summaarne seondumine	SS	SS1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	Summaarne seondumine	SS	SS2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	Summaarne seondumine	SS	SS3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	H10	4	Summaarne seondumine	SS	SS4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	Summaarne seondumine	SS	SS5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	Summaarne seondumine	SS	SS6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Tuleb silmas pidada, et kannud tähisega „Radiomärgis“ on inkubeerimise ajal tühjad. Ettenähtud 10 µl lisatakse ainult stsintillatsioonide loendamiseks.

▼**M8**

4. liide

hrER-IL PÕHINEVA KONKUREERIVA SEONDUMISE KATSE ANDMETE ANALÜÜSIMISE KAALUTLUSED

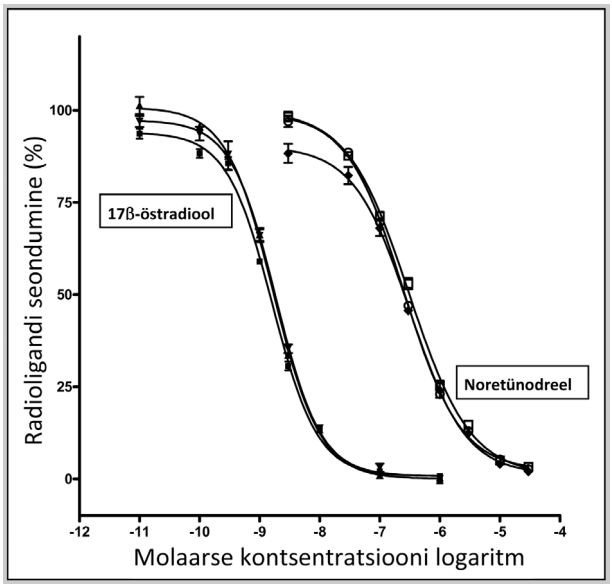
1. hr-α-ERil põhineva konkureeriva seondumise katse käigus mõõdetakse ühel kontsentratsioonil kasutatava [^{3}H]17β-östradiooli seondumist üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Konkureeriva seondumise kõver esitatakse graafikul nii, et ühel teljel on [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine ja teisel konkureeriva aine kontsentratsioon ($\log_{10}$-ühikutes). Uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine on 50 % maksimummäärast, on IC_{50} väärtus.

Võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine andmete analüüs (1)

2. Kontrollidega saadud andmete edasiseks analüüsimiseks need transformeeritakse (st [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilist seondumist väljendatakse protsentides ja kontrollkemikaali kontsentratsiooni logaritmituna). Positiivsete kontrollide (nt võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine) log IC_{50} hinnangulise väärtuse kindlakstegemiseks tuleks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparameetrilist Hilli võrrandit (nt BioSoft; GraphPad Prism) (2). Kõnealuste kõverate lähendamisel tuleks kõvera ülemine ja alumine osa, tõus ja log IC_{50} üldjuhul jätta piiritlemata. Parima lähenduskõvera leidmiseks tuleks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Tuleks märkida, millist robustse regressioonanalüüsi meetodit kasutatakse. Andmete korrigeerimine ligandi väljatõrjumise suhtes ei ole hrERil põhinevate FW ja CERI meetodite puhul vajalik, kuid seda võib vajaduse korral kaaluda. Pärast esmast analüüsi tuleks iga seondumiskõver üle vaadata, et veenduda mudeli ja andmete omavahelises sobivuses. Nõrgalt seonduva aine suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) leidmiseks võib arvutada nõrgalt seonduva aine log IC_{50} väärtuse protsentuaalne osakaal 17β-östradiooli log IC_{50} väärtusest. Positiivsete kontrollidega ja mitteseonduval ainel põhineva kontrolliga saadud tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt katsemeetodi tulemuslikkuse näitajatest ja nõuetekohasuse kriteeriumidest, mida on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis (punkt 20), 2. liites (FW analüüsimeetod, punktid 41–51) ja 3. liites (CERI analüüsimeetod, punktid 41–51). Võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva ainega läbi viidud kolme analüüsitsükli tulemusi hõlmavad näited on esitatud joonisel 1.

Joonis 1.

Võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduvat kontrollainet iseloomustavate konkureeriva seondumise kõverate näited



▼**M8**

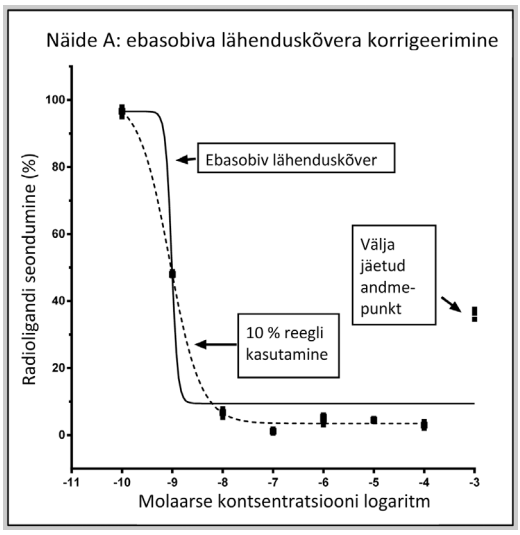
Uuritavate kemikaalide andmete analüüs

3. Kõigi uuritavate kemikaalide andmete analüüsimisel tuleks kasutada astmelist lähenemist, et tagada andmete asjakohane analüüs ja kõigi konkureeriva seondumise kõverate nõuetekohane liigitamine. Uuritava kemikaaliga läbi viidud iga analüüsitsükli puhul tuleks esmalt rakendada täpselt sama standardiseeritud andmeanalüüsi, mida kasutatakse võrdlusöstrogeenil ja nõrgalt seonduval ainel põhinevate kontrollide puhul. Pärast esmast analüüsi tuleks iga analüüsitsükli puhul teha lähenduskõvera parameetrite tehniline kontroll ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Tehnilise kontrolli käigus täheldatav kontsentratsioonist sõltuv [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilise seondumise protsentuaalse määra vähenemine, tehniliste paralleelproovide andmete vaheline väike varieeruvus kemikaali kõigil kontsentratsioonidel ja lähenduskõvera parameetrite sarnased väärtused kolmes analüüsitsüklis viitavad sellele, et katse ja andmeanalüüs on läbi viidud nõuetekohaselt. Uuritava kemikaaliga igas analüüsitsüklis saadud andmete hindamisel tuleks lähtuda eksperdihinnangust ja tulemused, mille alusel iga uuritav kemikaal liigitatakse seonduvaks või mitteseonduvaks, peaksid olema teaduslikult põhjendatavad.

4. Aeg-ajalt võib esineda andmeid, mis vajavad täiendavat tähelepanu, et hrERiga seondumise tulemusi oleks võimalik nõuetekohaselt analüüsida ja tõlgendada. Varasemates uuringutes on täheldatud juhtumeid, kus retseptoripõhise konkureeriva seondumise andmete analüüsi võib muuta keeruliseks asjaolu, et spetsiifilise seondumise protsentuaalne määr kemikaali suurimatel kontsentratsioonidel suureneb (joonis 2). See on tuntud probleem, millega on kokku puututud mitme retseptoripõhist konkureerivat seondumist käsitleva katse-eeskirja puhul (3). Sellistel juhtudel täheldatakse väiksematel kontsentratsioonidel kontsentratsioonist sõltuvust, kuid kui uuritava kemikaali kontsentratsioon läheneb lahustuvuspiirile, ei suurene [^{3}H]17β-östradiooli väljatõrjumine enam. Sellisel juhul nähtub suurematel kontsentratsioonidel saadud andmetest, et on jõutud analüüsimeetodi bioloogilise kasutuspiirini. Näiteks on seda nähtust paljudel juhtudel seostatud kemikaali mittelahustuvusega ja väljasadenemisega suurel kontsentratsioonil, kuid see võib olla põhjustatud ka asjaolust, et dekstraaniga kaetud süsi ei ole kemikaali suurimatel kontsentratsioonidel võimeline siduma eraldamisetapis enam rohkem radiomärgistatud vaba ligandi. Selliste andmepunktide sissejätmine sigmoidkõvera lähendamisel konkureeriva seondumise katse andmetele võib vahel põhjustada uuritava kemikaali valesti liigitamist ERiga seondumise võime alusel (joonis 2). Sellise olukorra ärahoidmiseks on hrERiga seondumisel põhinevate FW ja CERI meetodite katse-eeskirjas nähtud ette võimalus jätta analüüsist välja andmepunktid, kus [^{3}H]17β-östradiooli spetsiifilist seondumist iseloomustav paralleelproovide andmete keskväärtus on vähemalt 10 % suurem kui vastav keskväärtus mõnel väiksemal kontsentratsioonil (sellele viidatakse tavaliselt kui 10 % reeglile). Seda reeglit võib iga kõvera puhul kasutada ainult ühe korra ja seejuures peavad allesjäänud andmed hõlmama vähemalt kuut kontsentratsiooni, et kemikaali oleks võimalik kõvera alusel õigesti liigitada.

Joonis 2.

Näide konkureeriva seondumise kõvera kohta enne ja pärast 10 % reegli kasutamist

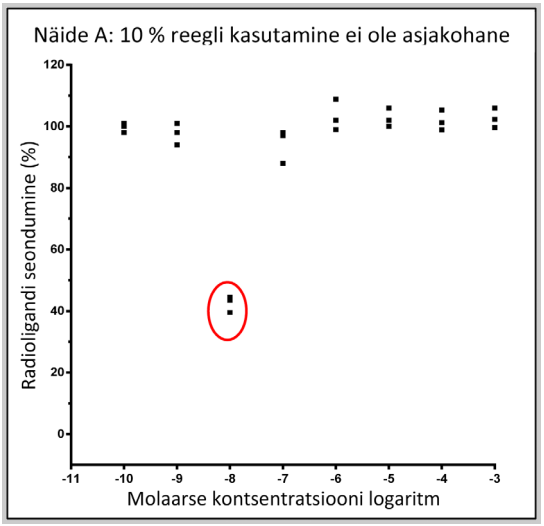


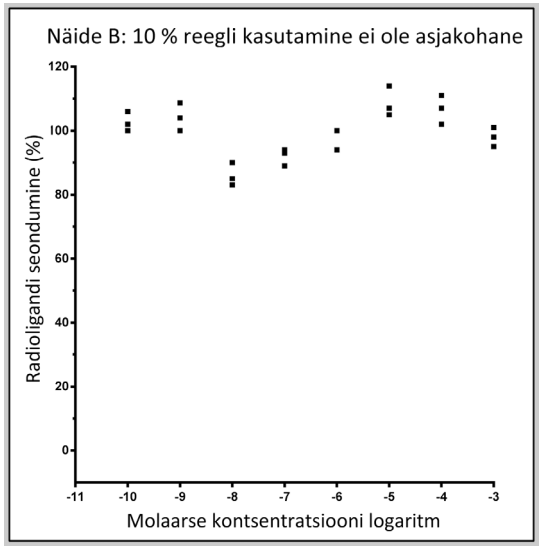
▼**M8**

5. Asjaomaste kõverate korrigeerimisel tuleks 10 % reegli asjakohast kasutamist hoolikalt kaaluda ja kasutada seda üksnes juhul, kui esineb selgeid viiteid selle kohta, et tegemist on hrERiga seonduva ainega. hrERiga seondumisel põhineva FW meetodi kohaste katsete tegemisel valideerimisuuringu raames täheldati, et 10 % reegli kasutamisel on mõnikord soovimatu ja ettenägematu tagajärg. Kemikaalide puhul, mis retseptoriga ei interakteeru (st tõelised mitteseonduvad ained), täheldati tasemel, kus radioligandi seondumine oli umbes 100 %, kasutatud kontsentratsioonide lõikes sageli varieeruvust, mis oli suurem kui 10 %. Kui väikseimale täheldatud väärtusele vastas juhtumisi väike kontsentratsioon, olnuks võimalik kõik sellest suuremal kontsentratsioonil saadud andmed 10 % reegli alusel analüüsist välja jätta, isegi kui kõnealustest andmetest võinuks olla kasu kemikaali liigitamisel mitteseonduvaks. Joonisel 3 on esitatud näited, mille puhul 10 % reegli kasutamine ei ole asjakohane.

Joonis 3.

Näited konkureeriva seondumise andmete kohta, mille puhul 10 % reegli kasutamine ei ole asjakohane





▼**M8**

Viited

(1) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα). Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 226. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(2) Motulsky, H., ja Christopoulos, A. (2003). The law of mass action. Väljaandes: Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression. GraphPad Software Inc., San Diego, CA. Lk 187–191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf.

(3) Laws, S. C., Yavanhxay, S., Cooper, R. L., ja Eldridge, J. C. (2006). Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. *Toxicol. Sci.* 94(1): 46–56.

▼M8

B.71. NAHA SENSIBILISEERIMISE *IN VITRO* KATSED, MILLEGA UURITAKSE DENDRIITRAKKUDE AKTIVEERIMISEGA SEOTUD OLULIST ETAPPI NAHA SENSIBILISEERIMISES SEISNEVA KAHJULIKU TOIME RAJAS

ÜLDINE SISSEJUHATUS

Dendriitrakkude aktiveerimisega seotud olulisel etapil põhinev katsemeetod

1. Naha sensibilisaator on aine, mis põhjustab nahaga kokkupuutel allergilise reaktsiooni, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (ÜRO GHS) (1) ja Euroopa Liidu määruses (EL) 1272/2008, milles käsitletakse ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus) ([1]). Naha sensibiliseerimise oluliste bioloogiliste etappide suhtes on olemas ühisarusaam. Praegused teadmised naha sensibiliseerimisega seotud keemiliste ja bioloogiliste mehhanismide kohta on kokku võetud kahjuliku toime radu käsitleva OECD programmiga hõlmatud asjaomase kahjuliku toime raja käsitluses (2), milles kirjeldatakse nii protsessi käivitavat molekulaarset sündmust, järgnevaid vaheetappe kui ka kahjuliku toime, st allergilise kontaktdermatiidi avaldumist. Kõnealusel juhul on käivitav molekulaarne sündmus (st esimene oluline etapp) elektrofiilsete ainete kovalentne seondumine naha valkude nukleofiilsete tsentritega. Kahjuliku toime raja teine oluline etapp toimub keratinotsüütides ning hõlmab nii põletikureaktsioone kui ka geeniekspressiooni muutusi, mis on seotud selliste konkreetsete signaaliülekanderadadega nagu antioksüdatiivse/elektrofiiliseoselise reaktsiooni elemendist (ARE) sõltuvad rajad. Kolmas oluline etapp on dendriitrakkude aktiveerimine, mida hinnatakse tavaliselt spetsiifiliste raku pinnamarkerite, kemokiinide ja tsütokiinide ekspressiooni alusel. Neljas oluline etapp on T-rakkude aktiveerimine ja paljunemine, mida hinnatakse kaudselt hiire lokaalsete lümfisõlmede katses (LLNA) (3).

2. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 442E (2017). Selles kirjeldatakse *in vitro* katseid, millega uuritakse naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime rajas dendriitrakkude aktiveerimisega seotud olulise etapi puhul kirjeldatud mehhanisme (2). Katsemeetodit kasutatakse selleks, et aidata kooskõlas ÜRO GHSi ja CLP-määrusega eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.

Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse järgmisi katseid:

— inimese rakuliini aktiveerimise katse (h-CLAT);

— rakuliini U937 aktiveerimise katse (U-SENS™);

— interleukiin 8 reportergeeni katse (IL-8 lutsiferaasikatse).

3. Käesolev katsemeetod ja OECD vastav katsejuhend võivad erineda andmete ja mõõdetavate näitajate saamiseks kasutatavate menetluste poolest, kuid OECD otsuse kohase andmete vastastikuse tunnustamise raames võib kasutada ükskõik kumba meetodit, et saada asjaomases riigis kehtivate nõuete kohaseid katsetulemusi naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime rajas dendriitrakkude aktiveerimisega seotud olulise etapi kohta.

([1]) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353/1, 31.12.2008).

▼M8

Olulisel etapil põhineva katsemeetodi kohaste katsete taust ja põhimõtted

4. Nahka sensibiliseeriva toime hindamiseks on tavaliselt kasutatud laboriloomi. Merisigade kasutamisel põhinevate klassikaliste meetoditega – merisigadega tehtava Magnussoni ja Kligmani maksimeerimiskatse ja Buehleri katsega (katsemeetod B.6) (4) – uuritakse nii naha sensibiliseerimise induktsioonikui ka esilekutsumisfaasi. Hiirtega läbi viidavate katsetega – LLNA (katsemeetod B.42) (3) ja selle kahe radioaktiivsest märgisest loobumist võimaldava modifikatsiooniga (LLNA: DA (katsemeetod B.50) (5) ja LLNA: BrdU-ELISA (katsemeetod B.51) (6)) – hinnatakse ainult indutseerivat toimet ja need on samuti heaks kiidetud, sest need on merisigadega tehtavate katsetega võrreldes eelistatud nii loomade heaolu seisukohast kui ka seepärast, et nendega saab naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi objektiivselt mõõta.

5. Viimasel ajal on kemikaalidest tingitud naha sensibiliseerimise ohu hindamiseks kasutusele võetud mehhanistlikul käsitlusel põhinevad *in chemico* ja *in vitro* katsemeetodid, millega uuritakse naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime raja esimest olulist etappi (katsemeetod B.59: otsene reaktsioonivõime katse peptiididega (7)) ja teist olulist etappi (katsemeetod B.60: ARE-Nrf2 lutsiferaasikatse (8)).

6. Käesoleva meetodi kohaste katsetega tehakse kvantitatiivselt kindlaks raku pinnamarkeri(te) (nt CD54, CD86) ekspressiooni muutus monotsüütide ja dendriitrakkude aktiveerimisel pärast kokkupuudet sensibilisaatoritega või dendriitrakkude aktiveerimisega seotud tsütokiini IL-8 ekspressiooni muutus. Naha sensibilisaatorite kohta on teatatud, et need indutseerivad selliste rakumembraani markerite nagu CD40, CD54, CD80, CD83 ja CD86 ekspressiooni, lisaks kutsuvad need esile dendriitrakkude aktiveerimisega seotud (2), põletikku soodustavate tsütokiinide, näiteks IL-1β ja TNF-α, ning mitme kemokiini, näiteks IL-8 (CXCL8) ja CCL3 ekspressiooni (9, 10, 11, 12).

7. Ent kuna dendriitrakkude aktiveerimine on ainult üks oluline etapp naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime rajas (2, 13), ei pruugi üksnes dendriitrakkude aktiveerimise markerite mõõtmisel põhinevate katsetega kogutud teave olla piisav, et teha järeldusi kemikaali nahka sensibiliseeriva toime olemasolu või puudumise kohta. Seepärast ollakse seisukohal, et käesoleva meetodiga saadud andmed võimaldavad toetada naha sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) eristamist nahka mitte sensibiliseerivatest kemikaalidest, kui neid andmeid kasutatakse katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi (edaspidi „ühtne lähenemisviis“) raames koos asjakohase täiendava teabega, näiteks teabega, mis on saadud naha sensibiliseerimises seisneva kahjuliku toime raja teisi olulisi etappe hõlmavate *in vitro* katsetega ning muude mittekatseliste meetoditega, sealhulgas võrdlemisel kemikaali analoogidega (13). On avaldatud näiteid kõnealuste katsetega saadud andmete kasutamisest vastavalt kindlaksmääratud metoodikale, mille puhul on standarditud nii kasutatavate teabeallikate kogum kui ka andmete töötlemise viis prognooside tegemiseks (13), ning neid saab rakendada ühtse lähenemisviisi kasulike osadena.

8. Käesoleva katsemeetodi kohaseid katseid ei saa kasutada eraldiseisvana selleks, et liigitada naha sensibilisaatoreid ÜRO GHSis / CLP-määruses määratletud alamkategooriatesse 1A või 1B ametiasutuste jaoks, kes neid mittekohustuslikke alamkategooriaid kasutavad, ega ka selleks, et prognoosida toime tugevust ohutushindamisega seotud otsuste tegemiseks. Sõltuvalt õigusraamistikust võib kõnealuste meetoditega saadud positiivseid tulemusi siiski kasutada eraldiseisvana kemikaali klassifitseerimiseks ÜRO GHSi / CLP-määruse kohasesse 1. kategooriasse.

▼M8

9. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse mõistet „uuritav kemikaal“ uurimisobjektile viitava mõistena ([1]) ning see ei ole seotud meetodi sobivusega ühest või mitmest koostisosast koosnevate ainete ja/või segude uurimiseks. Praegu on vähe andmeid meetodi kohaldatavuse kohta mitmest koostisosast koosnevate ainete ja segude puhul (14, 15). Kõnealuste katsete kasutamine mitmest koostisosast koosnevate ainete ja segude uurimiseks on tehniliselt võimalik. Enne katsemeetodi kasutamist selleks, et saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks siiski kaaluda, kas ja kuidas see meetod võimaldab saada taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavaid tulemusi. ([2]) Seda ei ole vaja kaaluda, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud. Peale selle tuleks mitmest koostisosast koosnevate ainete ja segude uurimisel võtta arvesse tsütotoksiliste koostisosade võimalikku segavat mõju vaadeldavatele toimetele.

KIRJANDUS

(1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Kuues, täiendatud väljaanne. New York ja Genf: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Kättesaadav aadressil https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/-PART1&docLanguage=En.

(3) Käesoleva lisa peatükk B.42 „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse“.

(4) Käesoleva lisa peatükk B.6 „Naha sensibiliseerimine“.

(5) Käesoleva lisa peatükk B.50 „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse: DA“.

(6) Käesoleva lisa peatükk B.51 „Naha sensibiliseerimine: lokaalsete lümfisõlmede katse: BrdU-ELISA“.

(7) Käesoleva lisa peatükk B.59 „Naha sensibiliseerimine *in chemico*: otsene reaktsioonivõime katse peptiididega (*direct peptide reactivity assay*, DPRA)“.

(8) Käesoleva lisa peatükk B.60 „Naha sensibiliseerimine *in vitro*: ARE-Nrf2 lutsiferaasi katsemeetod“.

(9) Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271–296.

(10) Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., ja Banchereau, J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 180: 1841–1847.

(11) Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., ja Tagami, H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27: 3031–3038.

([1]) 2013. aasta juunis lepiti OECD ühisistungil kokku, et võimalusel korral kasutatakse OECD uutes ja ajakohastatud katsejuhendites mõistet „uuritav kemikaal“ järjekindlamalt uurimisobjektile viitava mõistena.

([2]) Selle lause lisamise kohta tehti ettepanek ja selles lepiti kokku katsejuhendite programmi riiklike koordinaatorite töörühma koosolekul 2014. a aprillis.

▼**M8**

(12) Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z. U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., ja Tagami, H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. *J. Invest. Dermatol.* 120: 390–398.

(13) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 256. Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., ja Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38: 275–284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J. M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., ja Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29: 901–916.

▼**M8**

1. liide

NAHA SENSIBILISEERIMINE IN VITRO: INIMESE RAKULIINI AKTIVEERIMISE KATSE (H-CLAT)

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

1. Inimese rakuliini aktiveerimise katses tehakse inimese monotsüütse leukeemia rakuliinis THP-1 kindlaks monotsüütide ja dendriitrakkude aktiveerimisega seotud raku pinnamarkerite (CD86 ja CD54) ekspressiooni kvantitatiivsed muutused pärast kokkupuudet sensibilisaatoriga (1, 2). Seejärel kasutatakse raku pinnamarkerite CD86 ja CD54 ekspressiooni mõõdetud taset toetava teabena, mis aitab eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.

2. h-CLATd on hinnatud loomkatsete alternatiivide Euroopa Liidu referentlabori (EURL ECVAM) koordineeritud valideerimisuuringus ning seejärel on selle sõltumatult läbi vaadanud EURL ECVAMi teaduslik nõuandekomitee. Võttes arvesse kõiki kättesaadavaid andmeid ning reguleerivate asutuste ja sidusrühmade seisukohti, soovitas EURL ECVAM kasutada h-CLATd (3) ühtse lähenemisviisi osana, et aidata ohu alusel klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Näited h-CLATga saadud andmete kasutamisest muu teabega kombineerituna on avaldatud kirjanduses (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

3. h-CLAT on osutunud rakendatavaks laborites, kus on olemas rakukultuurimeetodite kasutamise ja läbivoolutsütomeetrilise analüüsi kogemus. Selle meetodi puhul eeldatav prognooside reprodutseeritavuse määr on nii laborisisese kui ka laboritevahelise reprodutseeritavuse puhul ligikaudu 80 % (3, 12). Valideerimisuuringust (13) ja muudest avaldatud uuringutulemustest (14) nähtub üldiselt, et LLNA tulemustega võrreldes on selles katses naha sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) mittesensibiliseerivatest kemikaalidest eristamise täpsus 85 % (N = 142), tundlikkus 93 % (94/101) ja spetsiifilisus 66 % (27/41) (vastavalt EURL ECVAMi kordusanalüüsile (12), milles võeti arvesse kõiki olemasolevaid andmeid ning vastavalt punktis 4 esitatud kirjeldusele jäeti arvestamata negatiivsed tulemused selliste kemikaalide puhul, mille log K_{ow} on suurem kui 3,5). h-CLAT kohaste valenegatiivsete prognooside tõenäosus on suurem vähesel määral kuni mõõdukalt nahka sensibiliseerivate (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1B) kemikaalide puhul ja väiksem siis, kui tegemist on tugevalt nahka sensibiliseeriva (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1A) kemikaaliga (4, 13, 15). Kokkuvõttes nähtub sellest teabest, et h-CLAT on kasulik meetod, mis aitab kindlaks teha naha sensibiliseerimise ohtu. Ainsa meetodina kasutatava h-CLATga saavutatav eespool nimetatud täpsus on siiski üksnes orienteeriv, sest katseandmeid tuleks vaadelda ühtse lähenemisviisi kontekstis koos muudest allikatest pärit teabega ja kooskõlas üldise sissejuhatuse punktide 7 ja 8 sätetega. Kui hinnatakse naha sensibiliseerimise katsemeetodeid, mille puhul ei kasutata katseloomi, tuleb lisaks arvesse võtta, et LLNA ja muude loomkatsete tulemused ei pruugi täielikult kajastada kemikaali toimet inimesele.

4. Praeguse olemasoleva teabe põhjal on tõendatud, et h-CLAT on kohaldatav paljude uuritavate kemikaalide puhul, mis erinevad üksteisest orgaanilise funktsionaalrühma, toimemehhanismi, *in vivo* katsetega määratud nahka sensibiliseeriva toime tugevuse ja füüsikalis-keemiliste omaduste poolest (3, 14, 15). h-CLAT on kohaldatav uuritavate kemikaalide puhul, mis on sobivas lahustis/kandeaines lahustuvad või moodustavad selles püsiva dispersiooni (st kolloidlahuse või suspensiooni, milles uuritav kemikaal ei sadestu ega eraldu lahustist/kandeainest eri faasi) (vt punkt 14). Kui uuritava kemikaali log K_{ow} on suurem kui 3,5, saadakse sageli valenegatiivsed tulemused (14). Seepärast tuleks uuritavate kemikaalide puhul, mille log K_{ow} on suurem kui 3,5, jätta negatiivsed tulemused arvesse võtmata. Kui uuritava kemikaali log K_{ow} on üle 3,5, võib saadud positiivseid tulemusi sellegipoolest kasutada uuritava kemikaali naha sensibilisaatoriks liigitamise toetamiseks. Peale

▼M8

selle võidakse kasutatud rakuliini piiratud metaboliseerimisvõime (16) või katsetingimuste tõttu saada h-CLATga negatiivseid tulemusi ka prohapteenide (st ained, mis vajavad ensümaatilist aktiveerimist, nt P450 ensüümide abil) ja prehapteenide (st ained, mis aktiveeruvad oksüdeerumisel) puhul, eelkõige aeglaselt oksüdeeruvad ainete puhul (15). h-CLAT võimaldab hinnata ka fluorestseeruvaid uuritavaid kemikaale (17), kuid tugevalt fluorestseeruvad uuritavad kemikaalid, mille kiiratava kiirguse lainepikkus on sama kui fluorestseiinisotiotsüanaadil (FITC) või propiidiumjodiidil (PI), segavad läbivoolutsütomeetrilist analüüsi ning neid ei ole võimalik FITCga konjugeeritud antikehade või PI abil õigesti hinnata. Sellisel juhul võib kasutada vastavalt muu fluorokroomiga märgistatud antikehasid või muud tsütotoksilisuse markerit, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 1.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et sellise fluorokroomi või markeriga saadakse samasugused tulemused kui FITCga märgistatud antikehade (vt punkt 24) või PIga (vt punkt 18). Eespool kirjeldatust lähtuvalt tuleks negatiivseid tulemusi tõlgendada kõnealuste piirangute kontekstis ja koos ühtse lähenemisviisi raames muudest allikatest saadud teabega. Kui leidub andmeid, mille kohaselt h-CLATd ei saa kasutada mõne muu konkreetse uuritavate kemikaalide rühma puhul, ei tohiks seda asjaomase konkreetse kemikaalirühma puhul kasutada.

5. Nagu eespool kirjeldatud, aitab h-CLAT eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Ent kui seda kasutatakse näiteks katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames, võib see aidata hinnata ka sensibiliseeriva toime tugevust (4, 5, 9). Võimalust kasutada h-CLATga saadud tulemusi toime tugevuse hindamisel on siiski vaja täiendavalt uurida, soovitatavalt inimuuringutest saadud andmete alusel.

6. Mõisted on esitatud liites 1.1.

KATSE PÕHIMÕTE

7. h-CLAT on *in vitro* meetod, millega määratakse kvantitatiivselt raku pinnamarkerite (CD86 ja CD54) ekspressiooni muutusi inimese monotsüütse leukeemia rakuliini THP-1 rakkudes pärast 24-tunnist kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Kõnealused pinnamolekulid on monotsüütse THP-1 tüüpilised markerid ja võivad võimaldada jäljendada dendriitrakkude aktiveerimist, millel on väga oluline roll T-rakkude aktivatsioonis. Pinnamarkerite ekspressiooni muutusi mõõdetakse läbivoolutsütomeetriliselt pärast rakkude värvimist fluorokroomiga märgistatud antikehadega. Samal ajal mõõdetakse ka tsütotoksilisust, et hinnata, kas pinnamarkerite ekspressiooni suurenemine toimub kontsentratsioonil, mille juures ei täheldata tsütotoksilisust. Arvutatakse pinnamarkerite fluorestsentssignaali suhteline tugevus lahustiga/kandeainega kontrolli näitajatega võrrelduna ja seda tulemust kasutatakse prognoosimudelis (vt punkt 26), et aidata eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

8. Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust ning kasutada selleks liites 1.2 loetletud kümmet pädevusainet. Lisaks peaksid meetodi kasutajad haldama reageerimisvõime kontrollimise käigus kogutud andmeid (vt punkt 11) ning positiivsete ja lahustiga/kandeainega kontrollidega saadud varasemaid andmeid (vt punktid 20–22) sisaldavat andmebaasi ning kontrollima nende andmete põhjal, kas katsetulemused on laboris aja möödudes jätkuvalt reprodutseeritavad.

▼M8

KATSE KÄIK

9. Käesolev meetod põhineb loomkatsetele alternatiivsete meetodite andmebaasi (DataBase on ALternative Methods, DB-ALM) teenusena kättesaadaval h-CLATd käsitleval katse-eeskirjal nr 158 (18), mis vastab EURL ECVAMi koordineeritud valideerimisuuringus kasutatud katse-eeskirjale. Seda katse-eeskirja soovitatakse kasutada laboris h-CLAT juurutamisel ja rakendamisel. Allpool kirjeldatakse h-CLAT põhikomponente ja katse käiku, mis koosneb kahest etapist: *annuse kindlaksmääramise katsest* ja *CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmisest*.

Rakkude ettevalmistamine

10. h-CLAT puhul tuleks kasutada inimese monotsüütse leukeemia rakuliini THP-1. Soovitatavalt tuleks rakud (TIB-202™) soetada usaldusväärsest rakupangast, näiteks Ameerika Tüüpkultuuride Kollektsioonist (American Type Culture Collection).

11. THP-1 rakke kasvatatakse 37°C juures reguleeritud õhuniiskusega 5-protsendilise CO_2-sisaldusega atmosfääris söötmes RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, 2-merkaptoetanooli kontsentratsioonis 0,05 mM, 100 ühikut penitsilliini milliliitri kohta ja streptomütsiini kontsentratsioonis 100 µg/ml. Penitsilliini ja streptomütsiini kasutamisest söötmes võib loobuda. Sel juhul peavad kasutajad siiski kontrollima, et antibiootikumide puudumine söötmest ei mõjuta tulemusi. Näiteks võib selleks teha katseid liites 1.2 loetletud pädevusainetega. Igal juhul tuleb saastumisohu vähendamiseks järgida rakukultuuridega töötamise head tava olenemata sellest, kas rakukultuuri sööde sisaldab antibiootikume või mitte. THP-1 rakke külvatakse regulaarselt iga 2–3 päeva järel ümber algtihedusega 0,1–0,2 × 10^6 rakku/ml. Kultuure tuleb säilitada tihedusvahemikus 0,1–1,0 × 10^6 rakku/ml. Enne rakkude kasutamist katses tuleb teha reageerimisvõime kontroll, et veenduda rakkude sobivuses. Rakkude reageerimisvõime kontroll tuleks teha kaks nädalat pärast sulatamist ning kasutada selleks positiivse kontrollina 2,4-dinitroklorobenseeni (DNCB) (CASi nr: 97-00-7; puhtus ≥ 99 %) ja nikkelsulfaati ($NiSO_4$) (CASi nr: 10101-97-0; puhtus ≥ 99 %) ning negatiivse kontrollina piimhapet (CASi nr: 50-21-5; puhtus ≥ 85 %). Nii DNCB kui ka $NiSO_4$ peaksid esile kutsuma raku pinnamarkerite CD86 ja CD54 alusel tuvastatava positiivse reaktsiooni, piimhape aga negatiivse reaktsiooni. Katses võib kasutada ainult reageerimisvõime kontrolli läbinud rakke. Rakke võib paljundada kuni kahe kuu jooksul pärast sulatamist. Passaažide arv ei tohiks ületada 30. Reageerimisvõime kontroll tuleb teha vastavalt punktides 20–24 esitatud kirjeldusele.

12. Katses kasutamiseks külvatakse THP-1 rakud välja tihedusega 0,1 × 10^6 rakku/ml või 0,2 × 10^6 rakku/ml ning eelkasvatatakse neid rakukultuuripudelis vastavalt 72 või 48 tundi. Rakkude tihedus rakukultuuripudelis peaks vahetult pärast eelkasvatamise perioodi lõppu olema igas katses võimalikult sarnane (selle saavutamiseks kasutatakse ühte kahest eespool kirjeldatud eelkasvatamise tingimusest), sest rakkude tihedus pudelis vahetult pärast eelkasvatamist võib mõjutada allergeenide indutseeritavat CD86/CD54 ekspressiooni (19). Katse päeval eemaldatakse rakud rakukultuuripudelist ja suspendeeritakse uuesti värskes söötmes tihedusel 2 × 10^6 rakku/ml. Seejärel jaotatakse rakud 500 µl kaupa 24-kannulise lamedapõhjalise plaadi kannudesse (1 × 10^6 rakku kannu kohta) või 80 µl kaupa 96-kannulise lamedapõhjalise plaadi kannudesse (1,6 × 10^5 rakku kannu kohta).

Annuse kindlaksmääramise katse

13. *Annuse kindlaksmääramise katse* eesmärk on leida CV75 väärtus ehk uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus on 75 % lahustiga/kandeainega kontrolli puhul täheldatud väärtusest. CV75 väärtuse põhjal tehakse kindlaks *CD86/CD54* ekspressiooni mõõtmisel (vt punktid 20–24) kasutatav uuritava kemikaali kontsentratsioon.

▼**M8**

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete ettevalmistamine

14. Uuritavad kemikaalid ja kontrollained valmistatakse ette katse tegemise päeval. h-CLAT puhul tehakse uuritavatest kemikaalidest lahus või püsiv dispersioon (vt ka punkt 4); lahustina/kandeainena kasutatakse eelistatavalt füsioloogilist lahust või söödet või kui uuritav kemikaal ei ole nendes lahustuv või ei moodusta neis püsivat dispersiooni, siis dimetüülsulfoksiidi (DMSO, puhtusega ≥ 99 %). Kemikaali lõppkontsentratsioon peab olema 100 mg/ml (füsioloogilises lahuses või söötmes) või 500 mg/ml (DMSOs). Kui see on teaduslikult piisavalt põhjendatud, võib kasutada ka eespool nimetatutest erinevat lahustit/kandeainet. Arvesse tuleks võtta uuritava kemikaali püsivust lahustis/kandeaines lõppkontsentratsioonil.

15. Uuritava kemikaali põhilahust kontsentratsiooniga 100 mg/ml (füsioloogilises lahuses või söötmes) või 500 mg/ml (DMSOs) lahjendatakse järgmiselt.

— Lahustina/kandeainena füsioloogilise lahuse või söötme kasutamisel: asjaomase lahustiga/kandeainega valmistatakse kahekordsete lahjenduste reana kaheksa eri kontsentratsiooniga põhilahust. Seejärel lahjendatakse neid põhilahuseid söötmes veel 50 korda (töölahused). Kui plaadil kasutataval suurimal lõppkontsentratsioonil 1 000 μg/ml ei täheldata mürgisust, tuleks maksimaalne kontsentratsioon uue tsütotoksilisuse katsega uuesti kindlaks määrata. Füsioloogilises lahuses või söötmes lahustatud või püsiva dispersiooni moodustanud uuritava kemikaali lõppkontsentratsioon plaadil ei tohiks ületada 5 000 μg/ml.

— Lahustina/kandeainena DMSO kasutamisel: asjaomase lahustiga/kandeainega valmistatakse kahekordsete lahjenduste reana kaheksa eri kontsentratsiooniga põhilahust. Seejärel lahjendatakse neid põhilahuseid söötmes veel 250 korda (töölahused). Lõppkontsentratsioon plaadil ei tohiks ületada 1 000 μg/ml, isegi kui sellel kontsentratsioonil ei täheldata mürgisust.

Seejärel kasutatakse töölahuseid kokkupuutekatses: plaadil olevale THP-1 rakkude suspensioonile lisatakse võrdne kogus töölahust (vt ka punkt 17), et saavutada täiendav kahekordne lahjendus (tavaliselt on lõppkontsentratsioonide vahemik plaadil 7,81–1 000 μg/ml).

16. h-CLAT puhul kontrollina kasutatav lahusti/kandeaine on sööde (kui uuritavast kemikaalist tehakse lahus või püsiv dispersioon (vt punkt 4) söötmes või füsioloogilises lahuses) või DMSO (kui uuritavast kemikaalist tehakse lahus või püsiv dispersioon DMSOs), mida kasutatakse plaadil ühes lõppkontsentratsioonis 0,2 %. Seda lahjendatakse samal viisil, nagu on kirjeldatud töölahuste saamist käsitlevas punktis 15.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainetega töötlemine

17. Punktides 15 ja 16 kirjeldatud sööde ja töölahused segatakse 24- või 96-kannulisele lamedapõhjalisele plaadile kantud rakususpensiooniga (vt punkt 12) mahuvahekorras 1:1. Seejärel inkubeeritakse töödeldud plaate 37°C juures 5-protsendilise CO_2-sisaldusega atmosfääris 24 ± 0,5 tundi. Tuleb jälgida, et lenduvad uuritavad kemikaalid ei aurustuks, ning hoida ära kannudevahelist uuritava kemikaaliga ristsaastumist. Selleks võib plaadi enne uuritava kemikaaliga inkubeerimist näiteks tihedalt kinni katta (20).

▼M8

Propiidiumjodiidiga (PI) värvimine

18. Pärast 24 ± 0,5 tundi kestnud kokkupuudet viiakse rakud katsutitesse ja eraldatakse tsentrifuugimise teel. Supernatant visatakse ära ja allesjäänud rakud suspendeeritakse uuesti 200 (96-kannulise plaadi puhul) või 600 (24-kannulise plaadi puhul) mikroliitris fosfaadiga puhverdatud soolalahuses, mis sisaldab 0,1 % veise seerumi albumiini (värvimispuhver). 200 µl rakususpensiooni viiakse üle 96-kannulisele ümarapõhjalisele plaadile (96-kannulise plaadi puhul) või mikrokatsutisse (24-kannulise plaadi puhul) ning rakke pestakse kaks korda 200 µl (96-kannulise plaadi puhul) või 600 µl (24-kannulise plaadi puhul) värvimispuhvriga. Lõpuks suspendeeritakse rakud uuesti värvimispuhvris (nt 400 µl) ning lisatakse PI lahus (nt 20 µl; PI lõppkontsentratsioon võib olla näiteks 0,625 µg/ml). Võib kasutada ka muid tsütotoksilisuse markereid, näiteks 7-aminoaktinomütsiin D-d (7-AAD) või trüpaansinist, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 1.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et asjaomase muu värvainega ja PIga saadavad tulemused on sarnased.

Tsütotoksilisuse mõõtmine läbivoolutsütomeetriga ja CV75 väärtuse hindamine

19. PI sisenemist rakkudesse analüüsitakse läbivoolutsütomeetriga; seejuures kasutatakse registreerimiskanalit FL3. Kokku registreeritakse 10 000 elusat (PIga värvumata) rakku. Tsütomeetri analüüsiprogrammi abil rakkude eluvõimelisuse arvutamiseks võib kasutada allpool esitatud valemit. Kui rakkude eluvõimelisus on väike, tuleks registreerida koos surnud rakkudega kokku kuni 30 000 rakku. Teine võimalus on registreerida andmeid ühe minuti jooksul alates analüüsi alustamise hetkest.

$$Rakkude\ eluvõimelisus = \frac{elusate\ rakkude\ arv}{registreeritud\ rakkude\ üldarv} \times 100$$

CV75 väärtus (vt punkt 13) ehk kontsentratsioon, mille juures elusate THP-1 rakkude osakaal on 75 % (tsütotoksilisus on 25 %), arvutatakse log-lineaarse interpolatsiooni teel järgmise valemiga:,

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

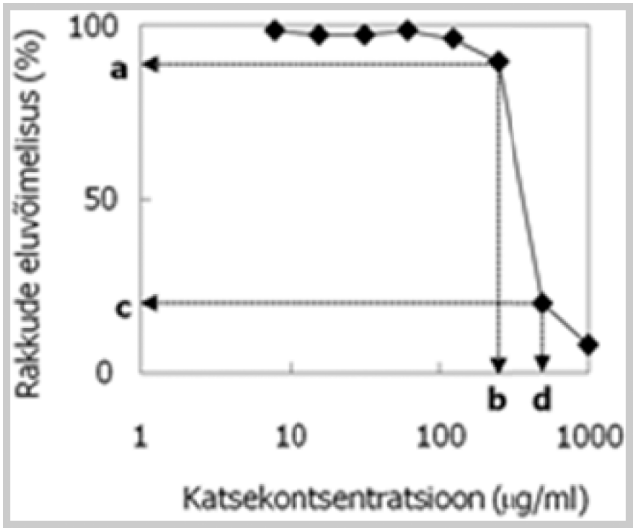
kus

a on rakkude eluvõimelisuse vähim väärtus, mis ületab 75 %,

c on rakkude eluvõimelisuse suurim väärtus, mis jääb alla 75 %, ning

b ja d on kontsentratsioonid, mille juures rakkude eluvõimelisus on vastavalt a või c.

▼M8



CV75 leidmiseks on lubatud kasutada ka muid meetodeid, kui on tõendatud (näiteks katsetega, mis on tehtud pädevusainetega), et see ei mõjuta tulemusi.

CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmine

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete ettevalmistamine

20. Uuritava kemikaali lahuse või püsiva dispersiooni valmistamiseks kasutatakse sobivat lahustit/kandeainet (füsioloogiline lahus, sööde või DMSO; vt punkt 14). Kõigepealt lahjendatakse uuritavat kemikaali kontsentratsioonini, mis on 100 korda (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või 500 korda (DMSO puhul) suurem kui 1,2 × CV75, mis on kindlaks tehtud *annuse kindlaksmääramise katsega* (vt punkt 19). Kui CV75 väärtust ei ole võimalik kindlaks teha (nt *annuse kindlaksmääramise katses* ei täheldata piisavat tsütotoksilisust), tuleks lähtekontsentratsioonina kasutada suurimat kontsentratsiooni, mille juures uuritav kemikaal on asjaomases lahustis/kandeaines veel lahustuv või moodustab selles püsiva dispersiooni. Tuleb silmas pidada, et lõppkontsentratsioon plaadil ei tohi olla suurem kui 5 000 µg/ml (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või 1 000 µg/ml (DMSO puhul). Seejärel tehakse vastava lahustiga/kandeainega 1,2-kordsete lahjenduste rida, et saada h-CLAT puhul kasutatavad põhilahused (kaheksa kontsentratsiooni vahemikus 100 × 1,2 × CV75 kuni 100 × 0,335 × CV75 (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või vahemikus 500 × 1,2 × CV75 kuni 500 × 0,335 × CV75 (DMSO puhul); annuste kasutamise näide on esitatud DB-ALMi katse-eeskirjas nr 158). Seejärel lahjendatakse põhilahuseid söötmes veel 50 korda (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või 250 korda (DMSO puhul) (töölahused). Neid töölahuseid kasutatakse lõpuks kokkupuutekatses, kus neist tehakse plaadil veel viimane kahekordne lahjendus. Kui rakkude eluvõimelisuse hindamise tulemused ei vasta punktides 29 ja 30 kirjeldatud nõuetekohasuse kriteeriumitele, võib CV75 väärtuse täpsemaks kindlakstegemiseks *annuse kindlaksmääramise katset* korrata. CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmiseks saab kasutada ainult 24-kannulisi plaate.

21. Lahustiga/kandeainega kontroll valmistatakse ette vastavalt punktis 16 esitatud kirjeldusele. h-CLAT puhul kasutatav positiivne kontroll on DNCB (vt punkt 11), millest tehakse DMSOs põhilahused, mida lahjendatakse vastavalt punktis 20 esitatud põhilahuste lahjendamise juhistele. DNCBd kasutatakse *CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmisel* positiivse kontrollina plaadil ühes lõppkontsentratsioonis (tavaliselt 4,0 µg/ml). DNCB kasutamiseks plaadil kontsentratsioonis 4,0 µg/ml valmistatakse DNCBst DMSOs põhilahus kontsentratsiooniga 2 mg/ml ning lahjendatakse seda seejärel söötmes 250 korda, et saada töölahus kontsentratsiooniga 8 µg/ml. Teise

▼M8

variandina võib positiivse kontrolli kontsentratsioonina kasutada DNCBga saadud CV75 väärtust, mis tehakse kindlaks igas katselaboris. Võib kasutada ka mõnda muud sobivat positiivset kontrolli, kui on olemas varasemad andmed, mis võimaldavad kindlaks määrata võrreldavad analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid. Positiivse kontrolli lõppkontsentratsioon plaadil ei tohiks olla suurem kui 5 000 µg/ml (füsioloogilise lahuse või söötme puhul) või 1 000 µg/ml (DMSO puhul). Analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid on samad kui uuritava kemikaali puhul (vt punkt 29), välja arvatud viimane nõuetekohasuse kriteerium, sest positiivset kontrolli hinnatakse vaid ühel kontsentratsioonil.

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainetega töötlemine

22. Iga uuritava kemikaali ja kontrollaine puhul on prognoosi saamiseks vaja ühte katset. Iga katse koosneb vähemalt kahest sõltumatust analüüsitsüklist *CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmiseks* (vt punktid 26–28). Iga sõltumatu analüüsitsükkel viiakse läbi eri päeval; samal päeval võib läbi viia mitu tsüklit juhul, kui iga analüüsitsükli, jaoks: a) valmistatakse sõltumatult värsked uuritava kemikaali põhilahused ja töölahused ning antikehade lahused; b) kasutatakse sõltumatult kogutud rakke (st rakud kogutakse erinevatest rakukultuuripudelitest); rakud võivad olla siiski samast passaažist. Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete töölahused (500 µl) segatakse 500 µl rakususpensiooniga (1×10^6 rakku) vahekorras 1:1 ja rakke inkubeeritakse 24 ± 0,5 tundi, nagu on kirjeldatud punktides 20 ja 21. Igas tsüklis piisab ühest proovist uuritava kemikaali ja kontrollaine iga kontsentratsiooni kohta, kuna prognoosi saamiseks on vaja vähemalt kahte sõltumatut tsüklit.

Rakkude värvimine ja analüüs

23. Pärast 24 ± 0,5 tundi kestnud kokkupuudet viiakse rakud 24-kannuliselt plaadilt katsutisse, kogutakse tsentrifuugimise teel ja seejärel pestakse kaks korda 1 ml värvimispuhvriga (vajaduse korral võib pesemisetappe lisada). Pärast värvimist blokeeritakse rakud 600 µl blokeerimislahusega (värvimispuhver, mis sisaldab 0,01 % (massiühikutes mahuühiku kohta) globuliini (inimese globuliini Cohni fraktsioonid II, III (SIGMA, #G2388-10G) või samaväärne)) ja inkubeeritakse neid 4°C juures 15 min. Pärast blokeerimist jaotatakse rakud kolme 180 µl suuruse alikvoodina 96-kannulisele ümarapõhjalisele plaadile või mikrokatsutitesse.

24. Pärast tsentrifuugimist värvitakse rakke 4°C juures 30 minuti vältel 50 µl CD86- või CD54-vastase antikehaga või hiire IgG1-ga (isotüübikontroll), mis on märgistatud FITCga. Tuleks kasutada DB-ALMi h-CLATi katse-eeskirjas nr 158 (18) kirjeldatud antikehasid, mis lahjendatakse värvimispuhvris mahuvahekorras 3: 25 (CD86 puhul (BD-PharMingen, #5556 57, kloon Fun-1)) või 3: 50 (CD54 puhul (DAKO, #F7143, kloon 6.5B5) ja IgG1 puhul (DAKO, #X0927)). Katsemeetodi väljatöötajate andmetel saavutatakse nimetatud lahjendusteguritega kõige paremsignaali ja müra suhe. Katsemeetodi väljatöötajate kogemuste põhjal on eri partiide antikehade fluorestsentssignaali tugevus tavaliselt sarnane. Kasutajad võivad siiski kaaluda antikehade tiitrimist oma labori tingimustes, et teha kindlaks kõige paremad kasutamiseks sobivad kontsentratsioonid. Mõne muu fluorokroomiga märgistatud CD86-vastaseid ja/või CD54-vastaseid antikehasid võib kasutada juhul, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 1.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et asjaomaste antikehade ja FITCga konjugeeritud antikehade puhul saadavad tulemused on sarnased. Tuleks arvesse võtta, et DB-ALMi h-CLATi katse-eeskirjas nr 158 (18) kirjeldatud antikehade klooni või tarnija vahetamine võib tulemusi mõjutada. Pärast vähemalt kaks korda

▼M8

150 µl värvimispuhvriga pesemist suspendeeritakse rakud uuesti värvimispuhvris (nt 400 µl), millele lisatakse PI lahust (nt 20 µl lõppkontsentratsiooni 0,625 µg/ml saamiseks) või muu tsütotoksilisuse markeri lahust (vt punkt 18). CD86 ja CD54 ekspressiooni taset ning rakkude eluvõimelisust analüüsitakse läbivoolutsütomeetriga.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete hindamine

25. CD86 ja CD54 ekspressiooni analüüsitakse läbivoolutsütomeetriga; seejuures kasutatakse registreerimiskanalit FL1. Fluorestsentssignaali tugevuse geomeetrilise keskväärtuse (*mean fluorescence intensity*, MFI) põhjal arvutatakse positiivse kontrolli rakkude CD86 ja CD54 puhul täheldatav fluorestsentssignaali suhteline tugevus (*relative fluorescence intensity*, RFI) vastavalt järgmisele valemile:.

$$RFI = \frac{\begin{array}{c}\textit{kemikaaliga töödeldud rakkude MFI} - \\ \textit{kemikaaliga töödeldud isotüübikontrolli rakkude MFI}\end{array}}{\begin{array}{c}\textit{lahustiga/kandeainega töödeldud rakkude MFI} - \\ \textit{lahustiga/kandeainega töödeldud isotüübikontrolli rakkude MFI}\end{array}} \times 100$$

Lisaks arvutatakse punktis 19 esitatud valemi järgi IgG1-ga värvitud isotüübikontrolli rakkude eluvõimelisus.

Prognoosimudel

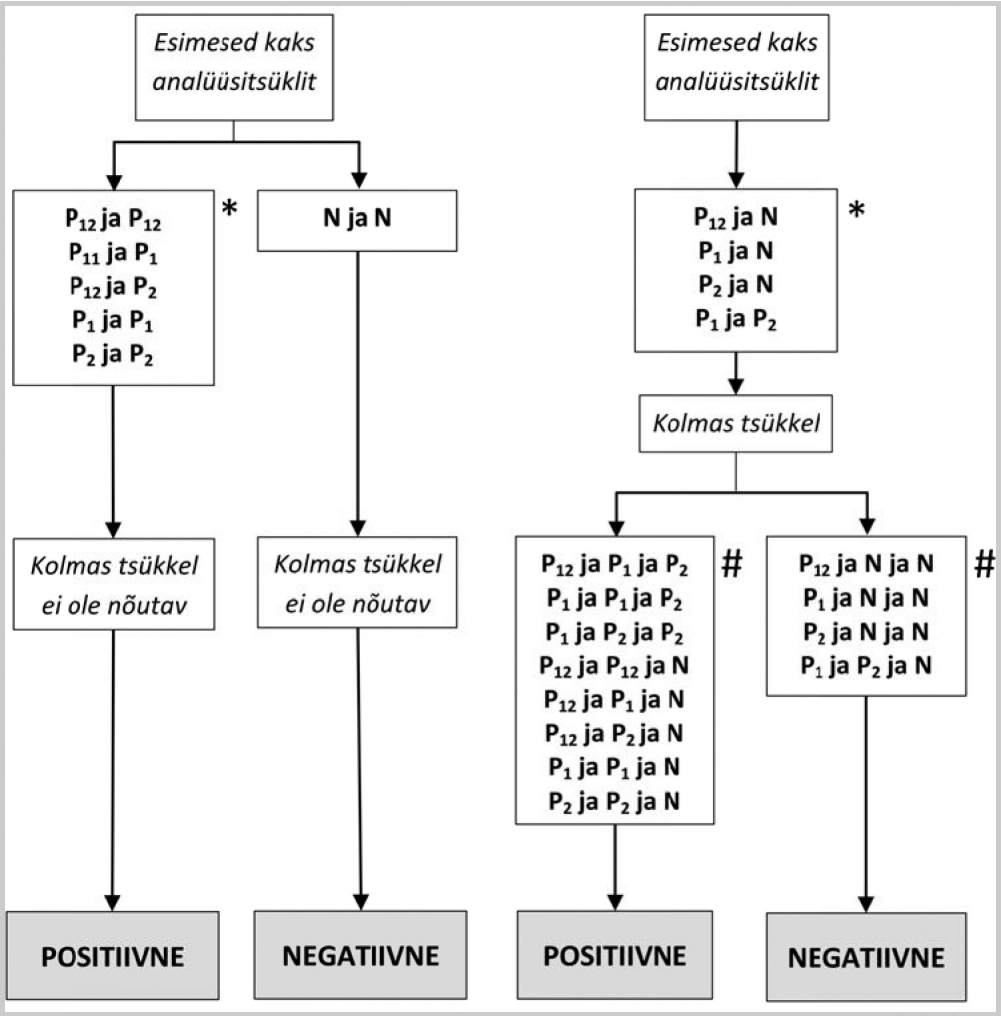
26. *CD86/CD54* ekspressiooni mõõtmisel hinnatakse iga uuritavat kemikaali vähemalt kahes sõltumatus analüüsitsüklis, mille põhjal tehakse üks prognoosijäreldus (POSITIIVNE või NEGATIIVNE). h-CLAT kohast prognoosi käsitatakse POSITIIVSENA, kui vähemalt kahes kolmest sõltumatust analüüsitsüklist on täidetud vähemalt üks järgmistest tingimustest; vastasel korral tunnistatakse h-CLAT kohane prognoos NEGATIIVSEKS (joonis 1):

— CD86 puhul on RFI mis tahes kasutatud kontsentratsioonil 150 % või suurem (ja rakkude eluvõimelisus ≥ 50 %);

— CD54 puhul on RFI mis tahes kasutatud kontsentratsioonil 200 % või suurem (ja rakkude eluvõimelisus ≥ 50 %).

27. Seega kui kahes esimeses analüüsitsüklis saadakse CD86 ja/või CD54 puhul positiivne tulemus, tunnistatakse h-CLAT kohane prognoos POSITIIVSEKS ja kolmandat analüüsitsüklit ei ole vaja läbi viia. Kui kahes esimeses analüüsitsüklis saadakse kummagi markeri puhul negatiivne tulemus, tunnistatakse h-CLAT kohane prognoos NEGATIIVSEKS (seejuures võetakse nõuetekohaselt arvesse punkti 30 sätteid) ja kolmandat tsüklit ei ole vaja. Kui aga kahe esimese tsükli tulemused ei lange vähemalt ühe markeri (CD54 või CD86) puhul kokku, on vaja kolmandat tsüklit ja lõplik prognoos tehakse kolme tsükli lõikes suurema osakaaluga tulemuse põhjal (st kaks kolmest). Seoses sellega tuleb silmas pidada, et kui viiakse läbi kaks sõltumatut tsüklit, millest ühes saadakse positiivne tulemus ainult CD86 puhul (edaspidi P_1) ja teises positiivne tulemus ainult CD54 puhul (edaspidi P_2), tuleb läbi viia kolmas tsükkel. Kui kolmandas tsüklis saadakse kummagi markeri puhul negatiivne tulemus (edaspidi N), tunnistatakse h-CLAT kohane prognoos NEGATIIVSEKS. Ent kui kolmandas tsüklis saadakse ükskõik kumma markeri puhul positiivne tulemus (P_1 või P_2) või mõlema markeri puhul positiivne tulemus (edaspidi P_{12}), tunnistatakse h-CLAT kohane prognoos POSITIIVSEKS.

▼**M8**



Joonis 1. h-CLAT puhul kasutatav prognoosimudel; h-CLAT kohast prognoosi tuleb arvesse võtta ühtse lähenemisviisi raamistikus ning kooskõlas üldise sissejuhatuse punktide 7 ja 8 sätetega

P_1 – analüüsitsükkel, kus ainult CD86 on positiivne; P_2 – analüüsitsükkel, kus ainult CD54 on positiivne; P_{12} – analüüsitsükkel, kus nii CD86 kui ka CD54 on positiivsed; N – analüüsitsükkel, kus ei CD86 ega CD54 ei ole positiivne.

* Kastides on esitatud kahe esimese analüüsitsükli tulemuste kombinatsioonid järjekorras, mis ei pruugi vastata nende saamise järjekorrale.

Kastides on esitatud kolme analüüsitsükli tulemuste kombinatsioonid lähtuvalt ülemises kastis esitatud kahe esimese tsükli tulemustest, kuid esitatu ei kajasta tulemuste saamise järjekorda.

28. h-CLAT kohase POSITIIVSE prognoosi saanud uuritava kemikaali puhul võib soovi korral määrata kaks toime avaldumise kontsentratsiooni: CD86 puhul EC150 ja CD54 puhul EC200. Need vastavad kontsentratsioonile, mille juures uuritava kemikaali põhjustatud RFI on vastavalt 150 või 200. Kui neid EC väärtusi kasutatakse näiteks katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames (4, 5, 6, 7, 8), võivad need aidata hinnata sensibiliseeriva toime tugevust (9). Neid saab arvutada järgmiste valemitega:

, ,

▼M8

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

kus

A_{conc} on väikseim kontsentratsioon (µg/ml), mille juures RFI > 150 (CD86) või 200 (CD54),

B_{conc} on suurim kontsentratsioon (µg/ml), mille juures RFI < 150 (CD86) või 200 (CD54),

A_{RFI} on RFI väärtus väikseimal kontsentratsioonil, mille juures RFI > 150 (CD86) või 200 (CD54), ning

B_{RFI} on RFI väärtus suurimal kontsentratsioonil, mille juures RFI < 150 (CD86) või 200 (CD54).

EC150 ja EC200 väärtuste täpsemaks määramiseks võib vaja minna kolme sõltumatut *CD86/CD54 ekspressiooni mõõtmist*. Lõplikud EC150 ja EC200 väärtused arvutatakse seejärel kolmes sõltumatus analüüsitsüklis saadud EC väärtuste mediaanina. Kui positiivsuse tingimused (vt punktid 26–27) on täidetud ainult kahes sõltumatus analüüsitsüklis kolmest, kasutatakse kahest asjaomasest arvutatud EC150 või EC200 väärtusest suuremat.

Nõuetekohasuse kriteeriumid

29. h-CLAT kasutamisel peaksid olema täidetud järgmised katse nõuetekohasuse kriteeriumid (22, 27).

— Söötmega ja lahustiga/kandeainega kontrollide puhul peaks rakkude eluvõimelisus olema suurem kui 90 %.

— Lahustiga/kandeainega kontrollis ei tohiks RFI väärtus CD86 ega CD54 puhul ületada positiivsuse kriteeriumi kohast väärtust (CD86 puhul RFI ≥ 150 % ja CD54 puhul RFI ≥ 200 %). Lahustiga/kandeainega kontrolli puhul arvutatakse RFI väärtus punktis 25 esitatud valemiga ("kemikaaliga" tuleks asendada muutujaga "lahustiga/kandeainega" ning "lahustiga/kandeainega töödeldud" tuleks asendada muutujaga "(söötmega) kontrolli").

— Söötmega ja lahustiga/kandeainega kontrollide puhul peaks nii CD86 kui ka CD54 puhul olema vastava MFI väärtuse ja isotüübikontrolliga saadud MFI väärtuse suhtarv > 105 %.

— Positiivse kontrolli (DNCB) puhul peaks RFI väärtus nii CD86 kui ka CD54 puhul vastama positiivsuse kriteeriumile (CD86 puhul RFI ≥ 150 % ja CD54 puhul RFI ≥ 200 %) ning rakkude eluvõimelisus peaks olema üle 50 %.

— Uuritava kemikaali puhul peaks rakkude eluvõimelisus olema igas tsüklis vähemalt neljal kasutatud kontsentratsioonil suurem kui 50 %.

30. Negatiivsed tulemused võetakse arvesse üksnes juhul, kui uuritava kemikaali puhul on rakkude eluvõimelisus suurimal katses kasutatud kontsentratsioonil (st 1,2 × CV75 vastavalt punktis 20 kirjeldatud järjestikuse lahjendamise skeemile) väiksem kui 90 %. Kui rakkude eluvõimelisus 1,2 × CV75 juures on 90 % või suurem, tuleks negatiivne tulemus kõrvale jätta. Sellisel juhul soovitatakse kasutatava annuse täpsustamiseks korrata CV75 määramist. Tuleb märkida, et kui uuritava kemikaali suurim katsekontsentratsioon on füsioloogilises lahuses (või söötmes või muus lahustis/kandeaines) 5 000 µg/ml või DMSOs 1 000 µg/ml või suurim kontsentratsioon, mille juures kemikaal veel lahustub, võetakse negatiivne tulemus arvesse ka siis, kui rakkude eluvõimelisus on üle 90 %.

▼M8

Katseprotokoll

31. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal

Ühest koostisosast koosnev aine:

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed), CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;

— füüsiline välimus, log K_{ow}, lahustuvus vees, lahustuvus DMSOs, molekulmass ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);

— kasutatud kontsentratsioon(id);

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt näiteks koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), puhtusest, kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest kättesaadavatest andmetest (vt eespool);

— füüsiline välimus, lahustuvus vees, lahustuvus DMSOs ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— teadaoleva koostisega segu/polümeeri puhul molekulmass või näiline molekulmass või muu uuringu tegemiseks asjakohane teave;

— vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);

— kasutatud kontsentratsioon(id);

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Kontrollid

Positiivne kontroll:

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed), CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;

— füüsiline välimus, log K_{ow}, lahustuvus vees, lahustuvus DMSOs, molekulmass ja vajaduse korral muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

▼**M8**

— vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);

— kasutatud kontsentratsioon(id);

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— vajaduse korral viide varasematele positiivse kontrolliga saadud tulemustele, millest nähtub vastavus asjakohastele analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Negatiivne ja lahustiga/kandeainega kontroll:

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed), CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;

— puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— asjaomases katsejuhendis nimetamata lahusti/kandeaine kasutamisel kontrollina kättesaadav teave selle füüsilise välimuse, molekulmassi ja muude asjakohaste füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Katsetingimused:

— sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

— kasutatud katsemeetodi kirjeldus;

— kasutatud rakuliin, selle säilitamise tingimused ning päritolu (nt asutus, kellelt rakud saadi);

— kasutatud läbivoolutsütomeeter (nt mudel) ja selle seaded, kasutatud globuliin, antikehad ja tsütotoksilisuse marker;

— pädevusainete analüüsimise meetod, mida kasutati labori pädevuse tõendamiseks, ning katsemeetodiga saadud tulemuste pikaajalise reprodutseeritavuse tõendamise viis, näiteks laboris kontrollidega ja/või reageerimisvõime kontrollimisel varem saadud andmed.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid:

— lahustiga/kandeainega kontrolli puhul saadud rakkude eluvõimelisuse, MFI ja RFI väärtused võrreldуna vastavate nõuetekohasust kajastavate vahemikega;

— positiivse kontrolliga saadud rakkude eluvõimelisuse ja RFI väärtused võrreldуna vastavate nõuetekohasust kajastavate vahemikega;

— rakkude eluvõimelisus uuritud kemikaali igal katses kasutatud kontsentratsioonil.

▼**M8**

Katse käik:

— analüüsitsüklite arv;

— uuritava kemikaali kontsentratsioonid, lisamisviis ja kasutatud kokkupuuteaeg (kui erineb soovitatust);

— kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;

— kõikide katse käigus tehtud muudatuste kirjeldus.

Tulemused:

— tabeli kujul andmed uuritava kemikaali ja positiivse kontrolli kohta igas analüüsitsüklis, sh CV75 (vajaduse korral), eraldi MFI, RFI ja rakkude eluvõimelisuse väärtused, EC150/EC200 väärtused (vajaduse korral) ning prognoosimudelil põhinev hinnang uuritava kemikaali kohta;

— vajaduse korral mis tahes muude asjakohaste vaatlusandmete kirjeldus.

Tulemuste arutelu:

— h-CLATga saadud tulemuste arutelu;

— katse tulemuste hindamine ühtse lähenemisviisi kontekstis, kui muu asjakohane teave on kättesaadav.

Järeldused

KIRJANDUS

(1) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., ja Toyoda, H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20: 767–773.

(2) Miyazawa, M., Ito, Y., Yoshida, Y., Sakaguchi, H., ja Suzuki, H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21: 428–437.

(3) EURL ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Kättesaadav aadressil https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations.

(4) Takenouchi, O., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Hirota, M., Ashikaga, T., ja Miyazawa, M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J. Appl. Toxicol.* 35: 1318–1332.

(5) Hirota, M., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Takenouchi, O., Ashikaga, T., ja Miyazawa, M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J. Appl. Toxicol.* 35: 1333–1347.

(6) Bauch, C., Kolle, S. N., Ramirez, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., ja Landsiedel, R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. *Regul. Toxicol. Parmacol.* 63: 489–504.

▼**M8**

(7) Van der Veen, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natch, A., van Loveren, H., ja Ezendam, J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69: 371–379.

(8) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., ja Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Parmacol.* 71: 337–351.

(9) Jaworska, J. S., Natsch, A., Ryan, C., Strickland, J., Ashikaga, T., ja Miyazawa, M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch. Toxicol.* 89: 2355–2383.

(10) Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D. M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., ja Casey, W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J. Appl. Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada, Y., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Hirota, M., Sakaguchi, H., Sasa, H., ja Nishiyama, N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26: 1150–60.

(12) EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Kättesaadav aadressil https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing.

(13) EURL ECVAM (2012). Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Kättesaadav aadressil https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations.

(14) Takenouchi, O., Miyazawa, M., Saito, K., Ashikaga, T., ja Sakaguchi, H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38: 599–609.

(15) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., ja Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38: 275–284.

(16) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., ja Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87: 1683–1969.

(17) Okamoto, K., Kato, Y., Kosaka, N., Mizuno, M., Inaba, H., Sono, S., Ashikaga, T., Nakamura, T., Okamoto, Y., Sakaguchi, H., Kishi, M., Kuwahara, H., ja Ohno, Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15: 81–88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol No. 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). 23 lk. Kättesaadav aadressil http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

▼**M8**

(19) Mizuno, M., Yoshida, M., Kodama, T., Kosaka, N., Okamato, K., Sono, S., Yamada, T., Hasegawa, S., Ashikaga, T., Kuwahara, H., Sakaguchi, H., Sato, J., Ota, N., Okamoto, Y., ja Ohno, Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13: 70–82.

(20) Sono, S., Mizuno, M., Kosaka, N., Okamoto, K., Kato, Y., Inaba, H., Nakamura, T., Kishi, M., Kuwahara, H., Sakaguchi, H., Okamoto, Y., Ashikaga, T., ja Ohno, Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7^{th} report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. *AATEX* 15: 89–96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No. 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis, Prantsusmaa. 96 lk.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(23) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Viies, täiendatud väljaanne. United Nations Publications, New York ja Genf. ISBN: 978-92-1-117006-1. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(24) Euroopa Kemikaalide Ökotoksikoloogia ja Toksikoloogia Keskus (ECETOC) (2003). Contact Sensitization: Classification According to Potency. Technical Report No. 87. Euroopa Kemikaalide Ökotoksikoloogia ja Toksikoloogia Keskus.

(25) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Okamoto, K., Mizuno, M., Sato, J., Yamada, T., Yoshida, M., Ota, N., Hasegawa, S., Kodama, T., Okamoto, Y., Kuwahara, H., Kosaka, N., Sono, S., ja Ohno, Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. *AATEX* 13: 27–35.

▼M8

Liide 1.1

MÕISTED

Aine: looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Analüüsitsükkel: ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine lahustiga/kandeainega kontrolli ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

Asjakohasus: näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (21).

CV75: hinnanguline kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus on 75 %.

EC150: kontsentratsioon, mille juures CD86 ekspressiooni kajastav RFI väärtus on 150.

EC200: kontsentratsioon, mille juures CD54 ekspressiooni kajastav RFI väärtus on 200.

Fluorestsentssignaali suhteline tugevus (RFI): kemikaaliga töödeldud rakkude fluorestsentssignaali tugevuse väärtuste geomeetrilise keskmise suhteline väärtus võrreldуna lahustiga/kandeainega töödeldud rakkude fluorestsentssignaali tugevuse väärtuste geomeetrilise keskmisega.

Kahjuliku toime rada: sündmuste ahel alates sihtkemikaali või rühma sarnaste kemikaalide keemilisest struktuurist sõltuvast käivitavast molekulaarsest sündmusest kuni vaadeldava toime avaldumiseni *in vivo* (22).

Katsete tegemist ja hindamist käsitlev ühtne lähenemisviis: struktureeritud lähenemisviis, mida kasutatakse kemikaali või rühma kemikaalide ohtlikkuse tuvastamiseks (võimalik toime), ohu kirjeldamiseks (toime tugevus) ja/või ohutuse hindamiseks (võimalik toime / toime tugevus ja kokkupuude) ning mille raames lõimitakse strateegiliselt ja kaalutakse läbi kõik asjakohased andmed võimalikku ohtu ja/või riski ja/või täiendavate sihipäraste ja seega minimaalses ulatuses katsete tegemise vajadust käsitleva regulatiivse otsuse tegemiseks.

Kemikaal: aine või segu.

Lahustiga/kandeainega kontroll: töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente peale uuritava kemikaali, sealhulgas lahustit/kandeainet. Selle abil tehakse kindlaks lähtetase samas lahustis/kandeaines lahustatud või püsiva dispersiooni moodustanud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide jaoks. Kui sellist töötlemata proovi hinnatakse paralleelselt söötmega kontrolliga, võimaldab see ühtlasi kindlaks teha, kas lahusti/kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Läbivoolutsütomeetria: tsütomeetriline meetod, mille puhul vedelikus suspendeeritud rakud liiguvad üksteise järel läbi ergastava valguse fookuse ning sellest tingitud valguse hajumise viis kajastab rakkude ja nende koostisosade omadusi; sageli märgistatakse rakud fluorestseeruvate markeritega, mille puhul valgus kõigepealt neeldub ja seejärel kiirgub muutunud sagedusel.

Mitmest koostisosast koosnev aine: aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

▼M8

Nõuetekohane katsemeetod: katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul peetakse piisavaks ning mis rajaneb teaduslikult usaldusväärsetel põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi nõuetekohane absoluutses tähenduses, vaid üksnes seoses teatud kindla eesmärgiga (21).

Ohtlikkus: mõjurit või olukorda iseloomustav omadus, millest võib tuleneda kahjulik toime, kui organism, süsteem või (alam)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Positiivne kontroll: paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Prehapteenid: kemikaalid, mis muutuvad sensibilisaatoriks abiootilise muundumise teel.

Prohapteenid: kemikaalid, mis vajavad nahka sensibiliseeriva toime tekkimiseks ensümaatilist aktiveerimist.

Segu: kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

Spetsiifilisus: katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (21).

Söötmega kontroll: töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Sellist proovi käideldakse koos uuritava kemikaaliga töödeldud proovidega ja muude kontrollproovidega, et teha kindlaks, kas lahusti/kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Tundlikkus: katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (21).

Täpsus: katsetulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (21).

Usaldusväärsus: näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus ning laborisisene korratavus (21).

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

▼M8

Värvimispuhver: fosfaadiga puhverdatud soolalahus, mis sisaldab 0,1 % veise seerumi albumiini.

Ühest koostisosast koosnev aine: aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS): süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavitustähiseid nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (23).

▼**M8**

Liide 1.2

PÄDEVUSAINED

Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust. Selleks tuleks h-CLAT kasutamisel saada tabelis 1 esitatud kümne soovitatava aine puhul eeldatavale tulemusele vastav prognoos ning CV75, EC150 ja EC200 väärtused, mis jäävad kümnest pädevusainest vähemalt kaheksa puhul asjaomasesse võrdlusvahemikku. Pädevusained on valitud nii, et nende puhul oleksid esindatud naha sensibiliseerimise ohuga seotud eri reaktsioonid. Peale selle on valikukriteeriumidena võetud arvesse ainete kaubanduslikku kättesaadavust, kvaliteetsete *in vivo* võrdlusandmete olemasolu ja h-CLATga saadud kvaliteetsete *in vitro* andmete olemasolu. Lisaks on h-CLAT kohta olemas avaldatud võrdlusandmed (3, 14).

Tabel 1.

h-CLAT kasutamise tehnilise pädevuse tõendamiseks soovitatavad ained

Pädevusained	CASi nr	Füüsikaline olek	**In vivo** toime prognoos (1)	CV75 võrdlusvahemik, µg/ml (2)	h-CLAT tulemus CD86 puhul (EC150 võrdlusvahemik, µg/ml) (2)	h-CLAT tulemus CD54 puhul (EC200 võrdlusvahemik, µg/ml) (2)
2,4-dinitroklorobenseen	97-00-7	Tahkis	Sensibilisaator (äärmiselt tugev)	2–12	Positiivne (0,5–10)	Positiivne (0,5–15)
4-fenüleendiamiin	106-50-3	Tahkis	Sensibilisaator (tugev)	5–95	Positiivne (< 40)	Negatiivne (> 1,5) (3)
Nikkelsulfaat	10101-97-0	Tahkis	Sensibilisaator (mõõdukas)	30–500	Positiivne (< 100)	Positiivne (10–100)
2-merkaptobensotiasool	149-30-4	Tahkis	Sensibilisaator (mõõdukas)	30–400	Negatiivne (> 10) (3)	Positiivne (10–140)
R(+)-limoneen	5989-27-5	Vedelik	Sensibilisaator (nõrk)	> 20	Negatiivne (> 5) (3)	Positiivne (< 250)
Imidasolidinüülkarbamiid	39236-46-9	Tahkis	Sensibilisaator (nõrk)	25–100	Positiivne (20–90)	Positiivne (20–75)
Isopropanool	67-63-0	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	> 5 000	Negatiivne (> 5 000)	Negatiivne (> 5 000)
Glütserool	56-81-5	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	> 5 000	Negatiivne (> 5 000)	Negatiivne (> 5 000)
Piimhape	50-21-5	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	1 500–5 000	Negatiivne (> 5 000)	Negatiivne (> 5 000)
4-aminobensoehape	150-13-0	Tahkis	Sensibiliseeriva toimeta	> 1 000	Negatiivne (> 1 000)	Negatiivne (> 1 000)

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber.

(1) *In vivo* ohu (ja toime tugevuse) prognoos põhineb LLNA andmetel (3, 14). *In vivo* toime tugevuse väljendamisel on lähtutud ECETOCi soovitatud kriteeriumidest (24).

(2) Varasemate katsete andmete põhjal (13, 25).

(3) Selle markeriga seotud varasemad tulemused on valdavalt negatiivsed, mistõttu negatiivne tulemus on üldjuhul ootuspärane. Esitatud vahemik on kindlaks määratud varasemate üksikute positiivsete tulemuste põhjal. Positiivse tulemuse korral peaks toime avaldumise kontsentratsioon jääma esitatud võrdlusvahemikku.

▼**M8**

2. liide

NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN VITRO*: RAKULIINI U937 AKTIVEERIMISE KATSE (U-SENS™)

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

1. Katsemeetodiga U-SENS™ tehakse inimese histiotsüütse lümfoomi rakuliinis U937 kindlaks monotsüütide ja dendriitrakkude aktiveerimisega seotud raku pinnamarkeri (CD86) ekspressiooni kvantitatiivsed muutused pärast kokkupuudet sensibilisaatoriga (1). Seejärel kasutatakse rakuliinis U937 mõõdetud raku pinnamarkeri CD86 ekspressioonitaset toetava teabena, mis aitab eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.

2. Katsemeetodit U-SENS™ on hinnatud L'Oreali koordineeritud valideerimisuuringus (2) ning seejärel on selle sõltumatult läbi vaadanud loomkatsete alternatiivide Euroopa Liidu referentlabori (EURL ECVAM) teaduslik nõuandekomitee (3). Võttes arvesse kõiki kättesaadavaid andmeid ning reguleerivate asutuste ja sidusrühmade seisukohti, soovitas EURL ECVAM kasutada katsemeetodit U-SENS™ (4) ühtse lähenemisviisi osana, et aidata ohu alusel klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Oma juhenddokumendis, milles käsitletakse naha sensibiliseerimisega seotud ühtse lähenemisviisi puhul kasutatavaid andmete lõimimise struktureeritud metoodikaid ja teabeallikaid, vaatleb OECD mitut juhtumiuuringut, milles kirjeldatakse eri katsestrateegiaid ja prognoosimudeleid. Üks kõnealustest kindlaksmääratud metoodikatest põhineb katsemeetodil U-SENS (5). Näited meetodiga U-SENS™ saadud andmete kasutamisest kombineerituna muu teabega, sealhulgas varasemate katseandmete ja nõuetekohastest inimuuringutest saadud andmetega (6) on avaldatud kirjanduses (4, 5, 7).

3. U-SENS™ on osutunud rakendatavaks laborites, kus on olemas rakukultuurimeetodite kasutamise ja läbivoolutsütomeetrilise analüüsi kogemus. Selle meetodi puhul eeldatav prognooside reprodutseeritavuse ligikaudne määr on laborisisese ja laboritevahelise reprodutseeritavuse puhul vastavalt 90 % ja 84 % (8). Valideerimisuuringust (8) ja muudest avaldatud uuringutulemustest (1) nähtub üldiselt, et LLNA tulemustega võrreldes on selles katses naha sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) mittesensibiliseerivatest kemikaalidest eristamise täpsus 86 % (N = 166), tundlikkus 91 % (118/129) ja spetsiifilisus 65 % (24/37). Inimuuringute tulemustega võrreldes on naha sensibilisaatorite (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) mittesensibiliseerivatest kemikaalidest eristamise täpsus 77 % (N = 101), tundlikkus 100 % (58/58) ja spetsiifilisus 47 % (20/43). LLNA tulemustega võrreldes on meetodi U-SENS™ kohaste valenegatiivsete prognooside tõenäosus suurem vähesel määral kuni mõõdukalt nahka sensibiliseerivate (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1B) kemikaalide puhul ja väiksem siis, kui tegemist on tugevalt nahka sensibiliseeriva (st ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1A) kemikaaliga (1, 8, 9). Kokkuvõttes nähtub sellest teabest, et U-SENS™ on kasulik meetod, mis aitab kindlaks teha naha sensibiliseerimise ohtu. Ainsa meetodina kasutatava U-SENS™-iga saavutatav eespool nimetatud täpsus on siiski üksnes orienteeriv, sest katseandmeid tuleks vaadelda ühtse lähenemisviisi kontekstis koos muudest allikatest pärit teabega ja kooskõlas üldise sissejuhatuse punktide 7 ja 8 sätetega. Kui hinnatakse naha sensibiliseerimise katsemeetodeid, mille puhul ei kasutata katseloomi, tuleb lisaks arvesse võtta, et LLNA ja muude loomkatsete tulemused ei pruugi täielikult kajastada kemikaali toimet inimesele.

▼**M8**

4. Praeguse olemasoleva teabe põhjal on tõendatud, et U-SENS™ on kohaldatav paljude uuritavate kemikaalide (sealhulgas kosmeetikatoodete koostisainete, nt säilitusainete, pindaktiivsete ainete, toimeainete, värvainete) puhul, mis erinevad üksteisest orgaanilise funktsionaalrühma, füüsikalis-keemiliste omaduste, *in vivo* katsetega määratud nahka sensibiliseeriva toime tugevuse ja teadaolevalt naha sensibiliseerimisega seotud reaktsioonimehhanismide (Michaeli aktseptor, Schiffi aluse teke, atsüülrühma ülekande reaktiiv, nukleofiilne bimolekulaarne asendusreaktsioon [SN2] või nukleofiilne aromaatne asendusreaktsioon [SNAr]) poolest (1, 8, 9, 10). U-SENS™ on kohaldatav uuritavate kemikaalide puhul, mis on sobivas lahustis/kandeaines lahustuvad või moodustavad selles püsiva dispersiooni (st kolloidlahuse või suspensiooni, milles uuritav kemikaal ei sadestu ega eraldu lahustist/kandeainest eri faasi) (vt punkt 13). Andmestikus esindatud kemikaalidega, mis on teadaolevalt prehapteenid (oksüdeerumisel aktiveeruvad ained) või prohapteenid (ained, mis vajavad ensümaatilist aktiveerimist, nt P450 ensüümide abil), saadi meetodi U-SENS™ kasutamisel õige prognoositulemus (1, 10). Membraani lõhkuvate ainete puhul võidakse CD86 ekspressiooni mittespetsiifilise suurenemise tõttu saada valepositiivsed tulemused, nagu nähtub asjaolust, et *in vivo* võrdlusliigitusest lähtuvalt saadud seitsmest valepositiivsest tulemusest kolm olid seotud pindaktiivsete ainetega (1). Seetõttu tuleks pindaktiivsete ainetega saadud positiivsetesse tulemustesse suhtuda ettevaatusega, aga pindaktiivsete ainetega saadudnegatiivseid tulemusi võib arvesse võtta uuritava kemikaali liigitamisel kemikaaliks, mis nahka ei sensibiliseeri. U-SENS™ võimaldab hinnata ka fluorestseeruvaid uuritavaid kemikaale (1), kuid tugevalt fluorestseeruvad uuritavad kemikaalid, mille kiiratava kiirguse lainepikkus on sama kui fluorestseiinisotiotsüanaadil (FITC) või propiidiumjodiidil (PI), segavad läbivoolutsütomeetrilist analüüsi ning neid ei ole võimalik FITCga konjugeeritud antikehade või PI abil õigesti hinnata (esimese puhul võidakse saada valepositiivsed tulemused ja teise puhul ei saa mõõta eluvõimelisust). Sellisel juhul võib kasutada vastavalt muu fluorokroomiga märgistatud antikehasid või muud tsütotoksilisuse markerit, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et sellise fluorokroomi või markeriga saadakse samasugused tulemused kui FITCga märgistatud antikehade või PIga (vt punkt 18). Eespool kirjeldatust lähtuvalt tuleks pindaktiivsete ainetega saadud positiivseid tulemusi ja tugevalt fluorestseeruvate uuritavate kemikaalidega saadud negatiivseid tulemusi tõlgendada kõnealuste piirangute kontekstis ja koos ühtse lähenemisviisi raames muudest allikatest saadud teabega. Kui leidub andmeid, mille kohaselt U-SENS™ ei sobi kasutamiseks mõne muu konkreetse uuritavate kemikaalide rühma puhul, ei tohiks seda asjaomase konkreetse kemikaalirühma puhul kasutada.

5. Nagu eespool kirjeldatud, aitab U-SENS™ eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Ent kui seda kasutatakse näiteks katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames, võib see aidata hinnata ka sensibiliseeriva toime tugevust. Võimalust kasutada meetodiga U-SENS™ saadud tulemusi toime tugevuse hindamisel on siiski vaja täiendavalt uurida, soovitatavalt inimuuringutest saadud andmete alusel.

6. Mõisted on esitatud liites 2.1.

KATSE PÕHIMÕTE

7. U-SENS™ on *in vitro* meetod, millega määratakse kvantitatiivselt raku pinnamarkeri CD86 ekspressiooni muutusi inimese histiotsüütse lümfoomi rakuliini U937 rakkudes pärast 45 ± 3 tunni pikkust kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Pinnamarker CD86 on üks U937 aktiveerimise tüüpiline marker. Teadaolevalt on CD86 kostimulatoorne molekul, mis võib võimaldada jäljendada monotsüütide aktiveerimist, millel on väga oluline roll T-rakkude aktivatsioonis. Pinnamarkeri CD86 ekspressiooni muutusi mõõdetakse läbivoolutsütomeetriliselt pärast rakkude värvimist, milleks tavaliselt kasutatakse fluorestseiinisotiotsüanaadiga (FITC) märgistatud antikehasid.

▼M8

Samal ajal mõõdetakse ka tsütotoksilisust (nt PIga), et hinnata, kas pinnamarkeri CD86 ekspressiooni suurenemine toimub kontsentratsioonil, mille juures ei täheldata tsütotoksilisust. Arvutatakse pinnamarkeri CD86 stimulatsiooniindeks (SI) lahustiga/kandeainega kontrolli näitajaga võrreldуna ja seda tulemust kasutatakse prognoosimudelis (vt punkt 19), et aidata eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

8. Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluva käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust ning kasutada selleks liites 2.2 loetletud kümmet pädevusainet kooskõlas *in vitro* meetodeid käsitleva hea tavaga (11). Lisaks peaksid meetodi kasutajad haldama reageerimisvõime kontrollimise käigus kogutud andmeid (vt punkt 11) ning positiivsete ja lahustiga/kandeainega kontrollidega saadud varasemaid andmeid (vt punktid 15–16) sisaldavat andmebaasi ning kontrollima nende andmete põhjal, kas katsetulemused on laboris aja möödudes jätkuvalt reprodutseeritavad.

KATSE KÄIK

9. Käesolev meetod põhineb loomkatsetele alternatiivsete meetodite andmebaasi (DataBase on ALternative Methods, DB-ALM) teenusena kättesaadaval U-SENS™-i käsitleval katse-eeskirjal nr 183 (12). Meetodi U-SENS™ laboris juurutamisel ja rakendamisel tuleks kasutada standardset töökorda. U-SENS™-i rakendamiseks võib kasutada automaatsüsteemi, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et sellise süsteemi kasutamisel saadakse sarnased tulemused. Allpool on kirjeldatud U-SENS™-i põhielemente ja katse käiku.

Rakkude ettevalmistamine

10. U-SENS™-i puhul tuleks kasutada inimese histiotsüütse lümfoomi rakuliini U937 (13). Soovitatavalt tuleks rakud (kloon CRL1593.2) soetada usaldusväärsest rakupangast, näiteks Ameerika Tüüpkultuuride Kollektsioonist (American Type Culture Collection).

11. U937 rakke kasvatatakse 37 °C juures reguleeritud õhuniiskusega 5-protsendilise CO_2-sisaldusega atmosfääris söötmes RPMI-1 640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, 2 mM L-glutamiini, 100 ühikut penitsilliini milliliitri kohta ja streptomütsiini kontsentratsioonis 100 µg/ml (täissööde). U937 rakke külvatakse regulaarselt iga 2–3 päeva järel ümber algtihedusega vastavalt 1,5 või 3×10^5 rakku/ml. Rakkude tihedus ei tohiks olla suurem kui 2×10^6 rakku/ml ja trüpaansinisega mittevärvumise alusel mõõdetud rakkude eluvõimelisus peaks olema ≥ 90 % (ei kohaldata esimesel sulatamisjärgsel väljakülvamisel). Enne katses kasutamist tuleks iga rakkude, veiselooteseerumi ja antikehade partii puhul teha reageerimisvõime kontroll, et veenduda nende sobivuses. Rakkude reageerimisvõime kontroll tuleks teha vähemalt üks nädal pärast sulatamist ning kasutada selleks positiivse kontrollina pikrüülsulfoonhapet (2,4,6-trinitrobenseensulfoonhape, TNBS) (CASi nr: 2 508-19-2; puhtus ≥ 99 %) ja negatiivse kontrollina piimhapet (CASi nr: 50-21-5, puhtus ≥ 85 %). Reageerimisvõime kontrollimisel tuleks kummagi kontrollkemikaali puhul kasutada kuut lõppkontsentratsiooni (TNBS puhul 1, 12,5, 25, 50, 75 ja 100 µg/ml ning piimhappe puhul 1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml). Täissöötmes lahustatud TNBS peaks esile kutsuma CD86 alusel tuvastatava positiivse kontsentratsioonist sõltuva reaktsiooni (nt kui kontsentratsioonile, mille puhul reaktsioon on positiivne, st CD86 SI ≥ 150, järgneb kontsentratsioon, mille juures CD86 SI kasvab) ning täissöötmes lahustatud piimhappe puhul peaks CD86 alusel saadav tulemus olema negatiivne (vt punkt 21). Katses tuleks kasutada üksnes reageerimisvõime kontrolli kaks korda läbinud rakke. Rakke võib paljundada kuni seitsme nädala jooksul pärast sulatamist. Passaažide arv ei tohiks ületada 21. Reageerimisvõime kontroll tuleks teha vastavalt punktides 18–22 esitatud kirjeldusele.

▼M8

12. Katses kasutamiseks külvatakse U937 rakud välja tihedusega 3×10^5 rakku/ml või 6×10^5 rakku/ml ning eelkasvatatakse neid rakukultuuripudelis vastavalt kaks päeva või üks päev. Eespool kirjeldatust erinevaid eelkasvatamise tingimusi võib kasutada juhul, kui see on teaduslikult piisavalt põhjendatud ja näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2. loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et saadavad tulemused on sarnased. Katse päeval eemaldatakse rakud rakukultuuripudelist ja suspendeeritakse uuesti värskes söötmes tihedusel 5×10^5 rakku/ml. Seejärel jaotatakse rakud 100 µl kaupa 96-kannulise lamedapõhjalise plaadi kannudesse (rakkude lõpptihedus on $0{,}5 \times 10^5$ rakku kannu kohta).

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainete ettevalmistamine

13. Enne katse tegemist hinnatakse lahustuvust. Selleks tehakse uuritavast kemikaalist lahus või püsiv dispersioon kontsentratsiooniga 50 mg/ml; lahustina/-kandeainena kasutatakse eelistatavalt täissöödet või kui uuritav kemikaal ei ole täissöötmes lahustuv, siis dimetüülsulfoksiidi (DMSO, puhtusega ≥ 99 %). Katse tegemiseks lahustatakse uuritav kemikaal täissöötmes lõppkontsentratsioonini 0,4 mg/ml, kui kemikaal on kõnealuses lahustis/kandeaines lahustuv. Kui kemikaal lahustub üksnes DMSOs, lahustatakse kemikaal selles kontsentratsioonil 50 mg/ml. Kui see on teaduslikult piisavalt põhjendatud, võib kasutada ka eespool nimetatutest erinevat lahustit/kandeainet. Tuleks võtta arvesse uuritava kemikaali püsivust lahustit/kandeainet sisaldavas lõpplahuses.

14. Uuritavad kemikaalid ja kontrollained valmistatakse ette katse tegemise päeval. Kuna annuse kindlaksmääramise katset ei tehta, kasutatakse esimeses analüüsitsüklis kuut lõppkontsentratsiooni (1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml) vastavas lahustis/kandeaines, milleks on kas täissööde või 0,4 % DMSOd sisaldav sööde. Järgnevate analüüsitsüklite jaoks valmistatakse uuritavast kemikaalist vastava lahusti/kandeaine abil vähemalt neli töölahust (st vähemalt nelja eri kontsentratsiooniga); seejuures alustatakse täissöötmes lahustamisel kontsentratsioonist 0,4 mg/ml ja DMSOs lahustamisel kontsentratsioonist 50 mg/ml. Lõpuks lisatakse töölahustega töötlemiseks plaadil olevale töölahusele võrdne kogus U937 rakkude suspensiooni (vt punkt 11), et saavutada täiendav kahekordne lahjendus (12). Võimalikes täiendavates analüüsitsüklites kasutatavad kontsentratsioonid (vähemalt neli) valitakse kõigi eelnenud analüüsitsüklite tulemuste põhjal (8). Kasutamiseks sobivad lõppkontsentratsioonid on 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ja 200 µg/ml. Suurim lubatud lõppkontsentratsioon on 200 µg/ml. Kui kontsentratsioonil 1 µg/ml täheldatakse CD86 puhul positiivset väärtust, hinnatakse kontsentratsiooni 0,1 µg/ml, et leida uuritava kemikaali selline kontsentratsioon, mille juures CD86-põhist positiivsuse lävivääртust ei ületata. Igas analüüsitsüklis, kus täheldatakse CD86-põhist kontsentratsioonist sõltuvat positiivset reaktsiooni, arvutatakse EC150 (kemikaali kontsentratsioon, mille juures saavutatakse CD86-põhine positiivsuse lävivääртus 150 %; vt punkt 19). Kui uuritav kemikaal kutsub esile kontsentratsioonist sõltumatu positiivse CD86-põhise-reaktsiooni, ei pruugi EC150 arvutamine olla asjakohane, nagu on kirjeldatud U-SENS™-i käsitlevas DB-ALMi katse-eeskirjas nr 183 (12). Igas analüüsitsüklis arvutatakse võimaluse korral alati CV70 (kontsentratsioon, mille juures kemikaali tsütotoksilisus saavutab lävivääртuse 70 %; vt punkt 19) (12). Et uurida CD86 taseme tõusu sõltuvust kontsentratsioonist, tuleks kasutamiseks sobivate kontsentratsioonide hulgast valida sellised kontsentratsioonid, mis on ühtlaselt jaotunud vahemikus EC150-st (või suurimast mittetsütotoksilisest kontsentratsioonist, mille juures CD86-põhine tulemus on negatiivne) kuni CV70-ni (või suurima lubatud kontsentratsioonini 200 µg/ml). Igas analüüsitsüklis tuleks kasutada vähemalt nelja kontsentratsiooni, millest kaks peaksid võrdlemise võimaldamiseks olema samad kui eelnenud analüüsitsükli(te)s.

▼M8

15. U-SENS™-i puhul kontrollina kasutatav lahusti/kandeaine on täissööde (kui uuritavast kemikaalist tehakse lahus või püsiv dispersioon söötmes) (vt punkt 4) või 0,4 % DMSO täissöötmes (kui uuritavast kemikaalist tehakse lahus või püsiv dispersioon DMSOs).

16. U-SENS™-i puhul kasutatav positiivne kontroll on TNBS (vt punkt 11), mille ettevalmistamiseks kasutatakse täissöödet. TNBSi tuleks CD86 ekspressiooni mõõtmisel kasutada plaadil positiivse kontrollina ühes lõppkontsentratsioonis (50 µg/ml), mille puhul rakkude eluvõimelisus on > 70 %. TNBSi kasutamiseks plaadil kontsentratsioonis 50 µg/ml valmistatakse TNBSist täissöötmes 1 M põhilahus (st kontsentratsiooniga 293 mg/ml) ning lahjendatakse seda seejärel täissöötmes 2 930 korda, et saada töölahus kontsentratsiooniga 100 µg/ml. Negatiivse kontrollina tuleks kasutada piimhapet (CASi nr: 50-21-5), mille põhilahusest kontsentratsiooniga 0,4 mg/ml valmistatakse täissöötmes lahus kontsentratsiooniga 200 µg/ml. Igas analüüsitsüklis valmistatakse igal plaadil ette kolm täissöödet sisaldava töötlemata kontrolli, lahustiga/kandeainega kontrolli ning negatiivse ja positiivse kontrolli paralleelproovi (12). Võib kasutada ka mõnda muud sobivat positiivset kontrolli, kui on olemas varasemad andmed, mis võimaldavad kindlaks määrata võrreldavad analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid. Kõnealused analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid on samad kui uuritava kemikaali puhul (vt punkt 12).

Uuritavate kemikaalide ja kontrollainetega töötlemine

17. Punktides 14–16 kirjeldatud lahustiga/kandeainega kontrollproovid ja töölahused segatakse 96-kannulisele lamedapõhjalisele plaadile kantud rakususpensiooniga (vt punkt 12) mahuvahekorras 1: 1. Seejärel inkubeeritakse töödeldavaid plaate 37 °C juures 5-protsendilise CO_2-sisaldusega atmosfääris 45 ± 3 tundi. Enne inkubeerimist kaetakse plaadid poolläbilaskva membraaniga, et takistada lenduvate uuritavate kemikaalide aurustumist ja uuritavate kemikaalidega töödeldud rakkude ristsaastumist (12).

Rakkude värvimine

18. Pärast 45 ± 3 tundi kestnud kokkupuudet viiakse rakud V-kujuliste kannudega mikrotiiterplaadile ja kogutakse tsentrifuugimise teel. Lahustuvushäire korral tekivad kristallid või tilgad, mis on mikroskoobi all vaadeldavad pärast 45 ± 3 tunni pikkust töötlemist (enne rakkude värvimist). Supernatant visatakse ära ja allesjäänud rakke pestakse üks kord 100 µl jääkülmas fosfaadiga puhverdatud soolalahuses (PBS), mis sisaldab 5 % veiselooteseerumit (värvimispuhver). Pärast tsentrifuugimist suspendeeritakse rakud uuesti 100 µl värvimispuhvris ja neid värvitakse 4 °C juures 30 minuti vältel valguse eest kaitstult 5 µl (nt 0,25 µg) CD86-vastase antikehaga või hiire IgG1ga (isotüübikontroll), mis on märgistatud FITCga. Tuleks kasutada U-SENS™-i käsitlevas DB-ALMi katse-eeskirjas nr 183 (12) kirjeldatud antikehasid (CD86 puhul: BD-PharMingen, katalooginumber 5556 57, kloon Fun-1, või Caltag/Invitrogen, katalooginumber MHCD8601, kloon BU63; IgG1 puhul: BD-PharMingen, katalooginumber 5557 48, või Caltag/Invitrogen, katalooginumber GM4992). Katsemeetodi väljatöötajate kogemuste põhjal on eri partiide antikehade fluorestsentssignaali tugevus tavaliselt sarnane. Katses võib kasutada muid kloone või muu tarnija antikehi, millega on edukalt viidud läbi reageerimisvõime kontroll (vt punkt 11). Kasutajad võivad siiski kaaluda antikehade tiitrimist oma labori tingimustes, et teha kindlaks kõige paremad kasutamiseks sobivad kontsentratsioonid. Mõnda muud tuvastamissüsteemi, näiteks muu fluorokroomiga märgistatud CD86-vastaseid antikehasid võib kasutada juhul, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et asjaomaste antikehadeja FITCga konjugeeritud antikehade puhul saadavad tulemused on sarnased. Pärast vähemalt kaks korda 100 µl värvimispuhvriga ja üks kord 100 µl jääkülma PBSiga pesemist suspendeeritakse rakud uuesti jääkülmas PBSis (nt katsuti kaupa käsitsi analüüsitavate proovide puhul

▼M8

125 mikroliitris või proovide automaatsisestamiseks ette nähtud plaadi kasutamisel 50 mikroliitris) ning lisatakse PI lahus (lõppkontsentratsioon 3 µg/ml). Võib kasutada ka muid tsütotoksilisuse markereid, näiteks 7-aminoaktinomütsiin D-d (7-AAD) või trüpaansinist, kui näiteks katsetega, mis tehakse liites 2.2 loetletud pädevusainetega, on võimalik tõendada, et asjaomase muu värvainega ja PIga saadavad tulemused on sarnased.

Läbivoolutsütomeetriga analüüsimine

19. CD86 ekspressioonitaset ja rakkude eluvõimelisust analüüsitakse läbivoolutsütomeetriga. Esimeses väravas R1 täheldatava rakupopulatsiooni selgeks tuvastamiseks ja rakuprügi elimineerimiseks kujutatakse rakke suuruse (FSC) ja granulaarsuse (SSC) punktdiagrammil, mis on esitatud logaritmskaalal. Iga kannu kohta registreeritakse väravas R1 kokku 10 000 rakku. Sama värava R1 rakke kujutatakse FL3 või FL4 ja SSC punktdiagrammil. Eluvõimeliste rakkude eristamiseks kasutatakse teist väravat R2, mille abil valitakse välja propiidiumjodiidi suhtes negatiivsete rakkude populatsioon (kanal FL3 või FL4). Tsütomeetri analüüsiprogrammi abil rakkude eluvõimelisuse arvutamiseks võib kasutada allpool esitatud valemit. Kui rakkude eluvõimelisus on väike, võib registreerida koos surnud rakkudega kokku kuni 20 000 rakku. Teine võimalus on registreerida andmeid ühe minuti jooksul alates analüüsi alustamise hetkest.

$$Rakkude\ eluvõimelisus = \frac{elusate\ rakkude\ arv}{registreeritud\ rakkude\ üldarv} \times 100$$

Seejärel mõõdetakse väravas R2 (R1 sees) olevate eluvõimeliste rakkude seas kanalis FL1 positiivsena registreeritud rakkude protsentuaalne osakaal. CD86 ekspressiooni rakkude pinnal analüüsitakse eluvõimelisi rakke (R2) kujutaval FL1 ja SSC punktdiagrammil.

Täissöötmega/IgG1ga kannude puhul seadistatakse analüüsimarker põhipopulatsioonile lähedale selliselt, et IgG1 signaaliga rakkude osakaal täissöötmega kontrollides jääks vahemikku 0,6–0,9 %.

Värvusest tulenev segav mõju avaldub nihkena FITCga märgistatud IgG1 punktdiagrammil (kanalis FL1 registreeritud IgG1 signaalile vastava SI geomeetriline keskmine on ≥ 150 %).

Töötlemata või 0,4 % DMSOd sisaldavate kontrollproovide rakkude ja kemikaaliga töödeldud rakkude CD86 stimulatsiooniindeks arvutatakse vastavalt järgmisele valemile:.

$$S.I. = \frac{CD86^{+} - rakkude\%\ töödeldud\ proovis - IgG1^{+-}rakkude\%\ töödeldud\ proovis}{CD86^{+-}rakkude\%\ kontrollis - IgG1^{+-}rakkude\%\ kontrollis} \times 100$$

$IgG1^{+}$-rakkude % töötlemata kontrollis – töötlemata eluvõimeliste rakkude seas analüüsimarkeriga kindlaks määratud, kanalis FL1 registreeritud positiivsete IgG1 signaaliga rakkude protsentuaalne osakaal (lubatav vahemik on ≥ 0,6 % ja < 1,5 %; vt punkt 22).

$IgG1^{+}/CD86^{+}$-rakkude % kontrollis/töödeldud proovis – kanalis FL1 registreeritud positiivsete IgG1/CD86 signaaliga rakkude protsentuaalne osakaal, mille mõõtmisel ei ole analüüsimarkerit eluvõimeliste kontrollrakkude / töödeldud rakkude suhtes nihutatud.

▼**M8**

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete hindamine

20. U-SENS™-i puhul arvutatakse järgmised näitajad: CV70 väärtus ehk kontsentratsioon, mille juures elusate U937 rakkude osakaal on 70 % (tsütotoksilisus on 30 %), ja EC150 väärtus ehk kontsentratsioon, mille juures uuritava kemikaali põhjustatud CD86 stimulatsiooniindeks (SI) on 150 %.

CV70 arvutatakse log-lineaarse interpolatsiooni teel järgmise valemiga:

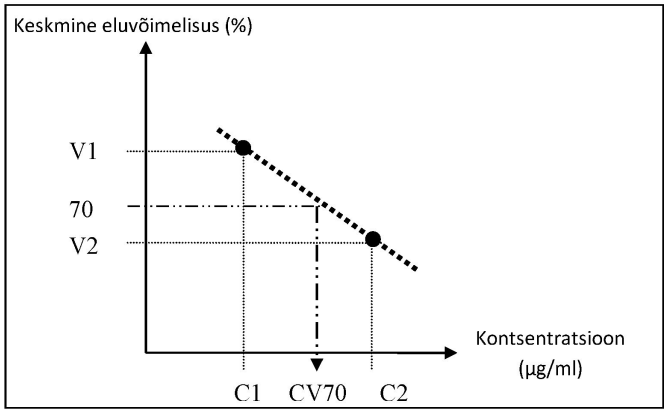
CV70 = C1 + [(V1 – 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)],

kus

V1 on rakkude eluvõimelisuse vähim väärtus, mis ületab 70 %,

V2 on rakkude eluvõimelisuse suurim väärtus, mis jääb alla 70 %, ning

C1 ja C2 on kontsentratsioonid, mille juures rakkude eluvõimelisus on vastavalt V1 või V2.



CV70 leidmiseks on lubatud kasutada ka muid meetodeid, kui on tõendatud (nt katsetega, mis on tehtud pädevusainetega), et see ei mõjuta tulemusi.

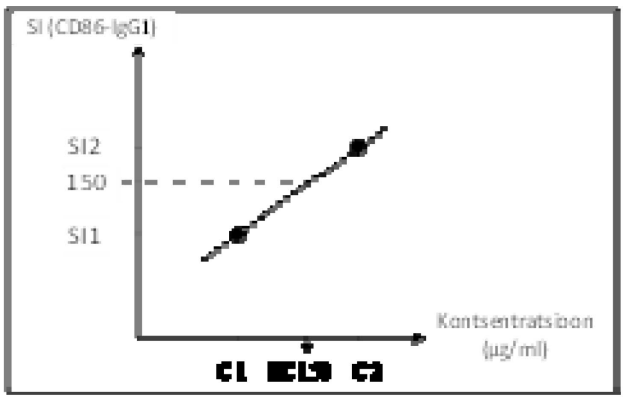
EC150 arvutatakse log-lineaarse interpolatsiooni teel järgmise valemiga:

EC150 = C1 + [(150 – SI1) / (SI2 – SI1) * (C2 – C1)],

kus

C1 on suurim kontsentratsioon (µg/ml), mille juures CD86 SI < 150 % (SI1), ja

C2 on vähim kontsentratsioon (µg/ml), mille juures CD86 SI ≥ 150 % (SI2).



▼M8

EC150 ja CV70 väärtused arvutatakse järgmiselt:

— iga analüüsitsükli puhul saadud konkreetseid EC150 ja CV70 väärtusi kasutatakse selleks, et uurida CD86 taseme tõusu sõltuvust kontsentratsioonist (vt punkt 14);

— keskmiste eluvõimelisuse väärtuste põhjal tehakse kindlaks üldine CV70 (12);

— keskmiste CD86 SI väärtuste põhjal tehakse U-SENS™-i kohase prognoosi järgi POSITIIVSEKS loetud uuritava kemikaali puhul (vt punkt 21) kindlaks üldine EC150 (12).

Prognoosimudel

21. CD86 ekspressiooni mõõtmisel hinnatakse iga uuritavat kemikaali vähemalt neljal kontsentratsioonil ja vähemalt kahes sõltumatus eri päevadel läbi viidavas analüüsitsüklis, mille põhjal tehakse üks prognoosijäreldus (NEGATIIVNE või POSITIIVNE).

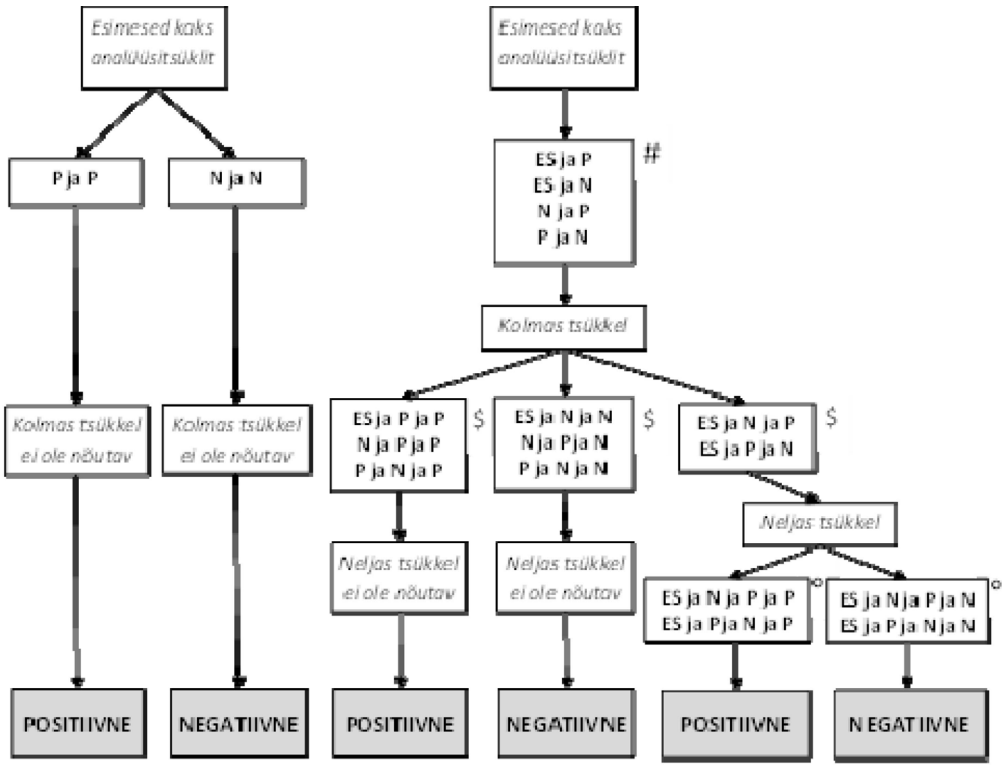
— U-SENS™-i iga üksiku analüüsitsükli kohast prognoosi käsitatakse negatiivsena (N), kui CD86 SI on kõigil mittetsütotoksilistel kontsentratsioonidel (rakkude eluvõimelisus on ≥ 70 %) alla 150 % ja ei täheldata segavat mõju (seoses tsütotoksilisusega, lahustuvusega (vt punkt 18) või värvusega (vt punkt 19), olenemata mittetsütotoksilisest kontsentratsioonist, mille juures segav mõju ilmneb). Kõigil muudel juhtudel – kui CD86 SI on 150 % või suurem ja/või täheldatakse segavat mõju – käsitatakse U-SENS™-i iga üksiku analüüsitsükli kohast prognoosi positiivsena (P).

— U-SENS™-i kohast prognoosi käsitatakse NEGATIIVSENA, kui vähemalt kahe sõltumatu analüüsitsükli kohased prognoosid on negatiivsed (N) (joonis 1). Kui kahes esimeses analüüsitsüklis saadakse negatiivne (N) tulemus, siis tunnistatakse U-SENS™-i kohane prognoos NEGATIIVSEKS ja kolmandat analüüsitsüklit ei ole vaja läbi viia.

— U-SENS™-i kohast prognoosi käsitatakse POSITIIVSENA, kui vähemalt kahe sõltumatu analüüsitsükli kohased prognoosid on positiivsed (P) (joonis 1). Kui kahes esimeses analüüsitsüklis saadakse positiivne (P) tulemus, siis tunnistatakse U-SENS™-i kohane prognoos POSITIIVSEKS ja kolmandat analüüsitsüklit ei ole vaja läbi viia.

— Kuna annuse kindlaksmääramise katset ei tehta, käsitatakse erandina olukorda, kus esimeses analüüsitsüklis on CD86 SI 150 % või suurem üksnes suurimal mittetsütotoksilisel kontsentratsioonil. Sel juhul käsitatakse analüüsitsüklis saadud tulemust EBASELGENA (ES) ning tuleks läbi viia täiendavad analüüsitsüklid, kus kasutatakse ka muid kontsentratsioone (mis jäävad suurima mittetsütotoksilise ja vähima tsütotoksilise kontsentratsiooni vahele; vt punkt 20). Kui analüüsitsükli tulemus on ES, tuleks läbi viia veel vähemalt kaks analüüsitsüklit, millele lisandub neljas analüüsitsükkel juhul, kui teise ja kolmanda tsükli tulemused (teineteisest sõltumatult N ja/või P) ei lange kokku (joonis 1). Täiendavate analüüsitsüklite tulemust käsitatakse positiivsena isegi juhul, kui CD86 SI väärtust 150 % või enam täheldatakse üksnes ühel mittetsütotoksilisel kontsentratsioonil, sest kontsentratsioone on kohandatud vastavalt konkreetsele uuritavale kemikaalile. Lõplik prognoos tehakse selle põhjal, millise tulemuse osakaal on kolme või nelja eraldi analüüsitsükli lõikes suurem (st kaks kolmest või kaks neljast) (joonis 1).

▼**M8**



Joonis 1. U-SENS™-i puhul kasutatav prognoosimudel; U-SENS™-i kohast prognoosi tuleks vaadelda ühtse lähenemisviisi raames ning kooskõlas punkti 4 ja üldise sissejuhatuse punktide 7, 8 ja 9 nõuetega

N – analüüsitsükkel, kus CD86 ei ole positiivne ja segavat mõju ei täheldata;

P – analüüsitsükkel, kus CD86 on positiivne ja/või täheldatakse segavat mõju;

ES – ebaselge; ebaselge tulemusega esimene analüüsitsükkel, kus CD86 on positiivne üksnes suurima mittetsütotoksilise kontsentratsiooni juures;

– üksnes esimese analüüsitsükli põhjal ebaselgeks (ES) loetud üksiktulemus tingib automaatselt vajaduse viia läbi kolmas analüüsitsükkel, et saavutada positiivsete (P) või negatiivsete (N) tulemuste ülekaal vähemalt kolmest sõltumatust analüüsitsüklist vähemalt kahes;

$ – kastides on esitatud kolme analüüsitsükli tulemuste kombinatsioonid lähtuvalt ülemises kastis esitatud kahe esimese tsükli tulemustest;

° – kastides on esitatud nelja analüüsitsükli tulemuste kombinatsioonid lähtuvalt ülemises kastis esitatud kolme esimese tsükli tulemustest.

Nõuetekohasuse kriteeriumid

22. Meetodi U-SENS™ kasutamisel peaksid olema täidetud järgmised katse nõuetekohasuse kriteeriumid (12).

— U937 rakkude keskmine eluvõimelisus kolmes töötlemata paralleelproovis peab 45 ± 3 tundi kestnud kokkupuute lõpus olema > 90 % ja CD86 ekspressioonis ei tohi esineda triivi. Töötlemata U937 rakkude CD86 ekspressiooni baastasemele vastav väärtus peab jääma vahemikku ≥ 2 % ja ≤ 25 %.

▼M8

— DMSO kasutamisel lahustina arvutatakse DMSO juuresolekul saadud SI võrrelduna töötlemata rakkudega saadud SIga, et hinnata kandeainena DMSOd sisaldava kontrolli nõuetekohasust; seejuures peab kolme paralleelproovi rakkude keskmine eluvõimelisus olema > 90 %. Kandeainena DMSOd sisaldav kontroll on nõuetekohane, kui selle kolme paralleelprooviga saadud CD86 SI keskväärtus on väiksem kui 250 % töötlemata U937 rakkude kolme paralleelprooviga saadud CD86 SI keskväärtusest.

— Analüüsitsükkel tunnistatakse nõuetekohaseks, kui töötlemata U937 rakkude puhul jääb vähemalt kaks kolmest IgG1ga saadud signaali väärtusest vahemikku ≥ 0,6 % ja < 1,5 %.

— Samaaegselt hinnatav negatiivne kontroll (piimhappega) tunnistatakse nõuetekohaseks, kui kolmest paralleelproovist vähemalt kaks on negatiivsed (CD86 SI on < 150 %) ja neis ei täheldata tsütotoksilisust (rakkude eluvõimelisus on ≥ 70 %).

— Positiivne kontroll (TNBSiga) tunnistatakse nõuetekohaseks, kui kolmest paralleelproovist vähemalt kaks on positiivsed (CD86 SI on ≥ 150 %) ja neis ei täheldata tsütotoksilisust (rakkude eluvõimelisus on ≥ 70 %).

Katseprotokoll

23. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal

Ühest koostisosast koosnev aine:

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;

— füüsiline välimus, lahustuvus täissöötmes, lahustuvus DMSOs, molekulmass ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);

— kasutatud kontsentratsioon(id);

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt näiteks koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), puhtusest, kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest kättesaadavatest andmetest (vt eespool);

— füüsiline välimus, lahustuvus täissöötmes, lahustuvus DMSOs ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— teadaoleva koostisega segu/polümeeri puhul molekulmass või näiline molekulmass või muu uuringu tegemiseks asjakohane teave;

— vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);

— kasutatud kontsentratsioon(id);

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

▼**M8**

Kontrollid

Positiivne kontroll:

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;

— füüsiline välimus, lahustuvus DMSOs, molekulmass ja vajaduse korral muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);

— kasutatud kontsentratsioon(id);

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— vajaduse korral viide varasematele positiivse kontrolliga saadud tulemustele, millest nähtub vastavus asjakohastele analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Negatiivne ja lahustiga/kandeainega kontroll:

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;

— puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— asjaomases katsejuhendis nimetamata lahusti/kandeaine kasutamisel kontrollina kättesaadav teave selle füüsilise välimuse, molekulmassi ja muude asjakohaste füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus.

Katsetingimused:

— sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

— kasutatud katsemeetodi kirjeldus;

— kasutatud rakuliin, selle säilitamistingimused ning päritolu (nt asutus, kellelt rakud saadi);

— kasutatud läbivoolutsütomeeter (nt mudel) ja selle seaded, kasutatud globuliin, antikehad ja tsütotoksilisuse marker;

— pädevusainete analüüsimise meetod, mida kasutati labori pädevuse tõendamiseks, ning katsemeetodiga saadud tulemuste pikaajalise reprodutseeritavuse tõendamise viis, näiteks laboris kontrollidega ja/või reageerimisvõime kontrollimisel varem saadud andmed.

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid:

— lahustiga/kandeainega kontrolli puhul saadud rakkude eluvõimelisuse ja CD86 SI väärtused võrrelduna vastavate nõuetekohasust kajastavate vahemikega;

▼**M8**

— positiivse kontrolliga saadud rakkude eluvõimelisuse ja SI väärtused võrreldуna vastavate nõuetekohasust kajastavate vahemikega;

— rakkude eluvõimelisus uuritud kemikaali igal katses kasutatud kontsentratsioonil.

Katse käik:

— analüüsitsüklite arv;

— uuritava kemikaali kontsentratsioonid, lisamisviis ja kasutatud kokkupuuteaeg (kui erineb soovitatust);

— kokkupuute kestus;

— kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;

— kõikide katse käigus tehtud muudatuste kirjeldus.

Tulemused:

— tabeli kujul andmed uuritava kemikaali ja positiivse kontrolli kohta igas analüüsitsüklis, sh CV70 (vajaduse korral), SI, rakkude eluvõimelisuse väärtused, EC150 väärtused (vajaduse korral) ja prognoosimudelil põhinev hinnang uuritava kemikaali kohta;

— vajaduse korral mis tahes muude asjakohaste vaatlusandmete kirjeldus.

Tulemuste arutelu:

— U-SENS™-iga saadud tulemuste arutelu;

— katse tulemuste hindamine ühtse lähenemisviisi kontekstis, kui muu asjakohane teave on kättesaadav.

Järeldused

KIRJANDUS

(1) Piroird, C., Ovigne, J. M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., ja Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29: 901–916.

(2) ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Kättesaadav aadressil http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations.

(3) ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2787/815737. Kättesaadav aadressil [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/588955. Kättesaadav aadressil https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3: 14.

▼**M8**

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 256. ENV/JM/-MONO(2016)29. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., ja Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71: 337–351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., ja Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol. In Vitro* 30: 373–382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., ja Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29: 259–270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., ja Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87: 1 683–1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance Document on Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECDFinal Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no. 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™). 33 lk. Kättesaadav aadressil http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(13) Sundström, C., ja Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17: 565–577.

(14) OECD (2005). Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Series on Testing and Assessment No. 34. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6. Kuues, täiendatud väljaanne. United Nations Publications, New York ja Genf. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Contact Sensitization: Classification According to Potency. Technical Report No. 87. Euroopa Kemikaalide Ökotoksikoloogia ja Toksikoloogia Keskus, Brüssel. Kättesaadav aadressil https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼**M8**

Liide 2.1

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Analüüsitsükkel – ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine lahustiga/-kandeainega kontrolli ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (14).

CD86 – le avalduv kontsentratsioonist sõltuv mõju sõltuvus kontsentratsioonist esineb juhul, kui positiivse tulemuse (CD86 SI $\geq$ 150) saamiseks vajalikule kontsentratsioonile järgneval kontsentratsioonil täheldatakse CD86 SI suurenemist.

CV70 – hinnanguline kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus on 70 %.

EC150 – hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul CD86 ekspressiooni kajastav SI on 150 %.

Kahjuliku toime rada – sündmuste ahel alates sihtkemikaali või rühma sarnaste kemikaalide keemilisest struktuurist sõltuvast käivitavast molekulaarsest sündmusest kuni vaadeldava toime avaldumiseni *in vivo* (15).

Katsete tegemist ja hindamist käsitlev ühtne lähenemisviis – struktureeritud lähenemisviis, mida kasutatakse kemikaali või rühma kemikaalide ohtlikkuse tuvastamiseks (võimalik toime), ohu kirjeldamiseks (toime tugevus) ja/või ohutuse hindamiseks (võimalik toime / toime tugevus ja kokkupuude) ning mille raames lõimitakse strateegiliselt ja kaalutakse läbi kõik asjakohased andmed võimalikku ohtu ja/või riski ja/või täiendavate sihipäraste ja seega minimaalses ulatuses katsete tegemise vajadust käsitleva regulatiivse otsuse tegemiseks.

Kemikaal – aine või segu.

Lahustiga/kandeainega kontroll – töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente peale uuritava kemikaali, sealhulgas lahustit/kandeainet. Selle abil tehakse kindlaks lähtetase samas lahustis/kandeaines lahustatud või püsiva dispersiooni moodustanud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide jaoks. Kui sellist töötlemata proovi hinnatakse paralleelselt söötmega kontrolliga, võimaldab see ühtlasi kindlaks teha, kas lahusti/kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Läbivoolutsütomeetria – tsütomeetriline meetod, mille puhul vedelikus suspendeeritud rakud liiguvad üksteise järel läbi ergastava valguse fookuse ning sellest tingitud valguse hajumise viis kajastab rakkude ja nende koostisosade omadusi; sageli märgistatakse rakud fluorestseeruvate markeritega, mille puhul valgus kõigepealt neeldub ja seejärel kiirgub muutunud sagedusel.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

Nõuetekohane katsemeetod – katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul peetakse piisavaks ning mis rajaneb teaduslikult usaldusväärsetel põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi nõuetekohane absoluutses tähenduses, vaid üksnes seoses teatud kindla eesmärgiga (14).

▼M8

Ohtlikkus – mõjurit või olukorda iseloomustav omadus, millest võib tuleneda kahjulik toime, kui organism, süsteem või (alam)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Prehapteenid – kemikaalid, mis muutuvad sensibilisaatoriks abiootilise muundumise, nt oksüdeerumise teel.

Prohapteenid – kemikaalid, mis vajavad nahka sensibiliseeriva toime tekkimiseks ensümaatilist aktiveerimist.

Segu – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

SI – stimulatsiooniindeks. Kemikaaliga töödeldud rakkude fluorestsentssignaali tugevuse väärtuste geomeetrilise keskmise suhteline väärtus võrrelduna lahustiga töödeldud rakkude fluorestsentssignaali tugevuse väärtuste geomeetrilise keskmisega.

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (14).

Triiv – triiv esineb juhul, kui i) kolmanda töötlemata kontrollprooviga saadud korrigeeritud $CD86^{+}$ (%) väärtus on väiksem kui 50 % esimese ja teise töötlemata kontrollprooviga saadud korrigeeritud $CD86^{+}$ (%) väärtuste keskmisest ning ii) negatiivse kontrolli kolmanda prooviga saadud korrigeeritud $CD86^{+}$ (%) väärtus on väiksem kui 50 % negatiivse kontrolli esimese ja teise prooviga saadud korrigeeritud $CD86^{+}$ (%) väärtuste keskmisest.

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (14).

Täpsus – katsetulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (14).

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus ning laborisisene korratavus (14).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

▼M8

Värvimispuhver – fosfaadiga puhverdatud soolalahus, mis sisaldab 5 % veiselooteseerumit.

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavitustähiseid nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (16).

▼**M8**

Liide 2.2

PÄDEVUSAINED

Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust. Selleks tuleks U-SENS™-i kasutamisel saada tabelis 1 esitatud soovitatava kümne aine puhul eeldatavale tulemusele vastav prognoos ning CV70 ja EC150 väärtused, mis jäävad kümnest pädevusainest vähemalt kaheksa puhul asjaomasesse võrdlusvahemikku. Pädevusained on valitud nii, et nende puhul oleksid esindatud naha sensibiliseerimise ohuga seotud eri reaktsioonid. Peale selle on valikukriteeriumidena võetud arvesse ainete kaubanduslikku kättesaadavust, kvaliteetsete *in vivo* võrdlusandmete olemasolu ja U-SENS™-iga saadud kvaliteetsete *in vitro* andmete olemasolu. Lisaks on U-SENS™-i kohta olemas avaldatud võrdlusandmed (1, 8).

Tabel 1. 1

U-SENS™-i kasutamise tehnilise pädevuse tõendamiseks soovitatavad ained

Pädevusained	CASi nr	Füüsikaline olek	*In vivo* toime prognoos ([1])	U-SENS Lahusti/ kandeaine	U-SENS CV70 võrdlusvahemik, µg/ml ([2])	U-SENS EC150 võrdlusvahemik, µg/ml ([2])
4-fenüleendiamiin	106-50-3	Tahkis	Sensibilisaator (tugev)	Täissööde ([3])	< 30	Positiivne (≤ 10)
Pikrüülsulfoonhape	2508-19-2	Vedelik	Sensibilisaator (tugev)	Täissööde	> 50	Positiivne (≤ 50)
Dietüülmaleaat	141-05-9	Vedelik	Sensibilisaator (mõõdukas)	DMSO	10–100	Positiivne (≤ 20)
Resortsinool	108-46-3	Tahkis	Sensibilisaator (mõõdukas)	Täissööde	> 100	Positiivne (≤ 50)
Kaneelalkohol	104-54-1	Tahkis	Sensibilisaator (nõrk)	DMSO	> 100	Positiivne (10–100)
4-allüülanisool	140-67-0	Vedelik	Sensibilisaator (nõrk)	DMSO	> 100	Positiivne (< 200)
Sahhariin	81-07-2	Tahkis	Sensibiliseeriva toimeta	DMSO	> 200	Negatiivne (> 200)
Glütserool	56-81-5	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	Täissööde	> 200	Negatiivne (> 200)
Piimhape	50-21-5	Vedelik	Sensibiliseeriva toimeta	Täissööde	> 200	Negatiivne (> 200)
Salitsüülhape	69-72-7	Tahkis	Sensibiliseeriva toimeta	DMSO	> 200	Negatiivne (> 200)

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber.

([1]) *In vivo* ohu (ja toime tugevuse) prognoos põhineb LLNA andmetel (1, 8). *In vivo* toime tugevuse väljendamisel on lähtutud ECETOCi soovitatud kriteeriumidest (17).

([2]) Varasemate katsete andmete põhjal (1, 8).

([3]) Täissööde – sööde RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, 2 mM L-glutamiini, 100 ühikut penitsilliini milliliitri kohta ja streptomütsiini kontsentratsioonis 100 µg/ml (8).

▼**M8**

3. liide

NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN VITRO*: IL-8 LUTSIFERAASIKATSE

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

1. Erinevalt raku pinnamarkerite ekspressiooni analüüsimiseks ette nähtud katsetest mõõdetakse IL-8 lutsiferaasikatsega muutusi IL-8 ekspressioonis. IL-8 on tsütokiin, mis on seotud dendriitrakkude aktiveerimisega. IL-8 ekspressiooni mõõdetakse THP-1 baasil loodud IL-8 reporterrakuliinis (THP-G8, mis on saadud inimese ägeda monotsüütse leukeemia rakuliinist THP-1) pärast rakkude kokkupuudet sensibilisaatoriga (1). Selle meetodi puhul hinnatakse lutsiferaasi ekspressiooni, et aidata eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri.

2. IL-8 lutsiferaasikatse meetodit on hinnatud Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Jaapani Keskuse (JaCVAM), **Jaapani majandus-, kaubandus- ja tööstusministeeriumi** ning **Loomkatsete Alternatiivide Jaapani Ühingu (JSAAE)** läbi viidud valideerimisuuringus (2) ning seejärel on see vastastikuse eksperdihinnangu raames sõltumatult läbi vaadatud (3) JaCVAMi ning Jaapani tervishoiu-, töö- ja sotsiaalministeeriumi egiidi all ning **alternatiivsete meetodite alase rahvusvahelise koostöö foorumi** (ICATM) toetusel. Kõikidest kättesaadavatest andmetest ning reguleerivate asutuste ja sidusrühmade seisukohtadest lähtuvalt peetakse IL-8 lutsiferaasikatset ühtse lähenemisviisi kasulikuks osaks, mis võimaldab aidata ohu alusel klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Näited IL-8 lutsiferaasikatsega saadud andmete kasutamisest muu teabega kombineerituna on avaldatud kirjanduses (4, 5, 6).

3. IL-8 lutsiferaasikatse meetod on osutunud rakendatavaks laborites, kus on olemas rakukultuuride kasutamise ja lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmise kogemus. Laborisisese ja laboritevahelise reprodutseeritavuse määr on vastavalt 87,7 % ja 87,5 % (2). Valideerimisuuringu (2) ja muude avaldatud tööde (1, 6) andmetest nähtub, et LLNA tulemustega võrreldes liigitati IL-8 lutsiferaasikatsega 143 kemikaalist 118 positiivseks või negatiivseks ja 25 kemikaali puhul oli tulemus ebaselge ning IL-8 lutsiferaasikatses oli naha sensibilisaatorite (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt 1. kategooria kemikaalide) mittesensibiliseerivatest kemikaalidest (ÜRO GHSi /CLP-määruse kohaselt kategoriseerimata kemikaalidest) eristamise täpsus 86 % (101/118), tundlikkus 96 % (92/96) ja spetsiifilisus 41 % (9/22). Kui allpool kirjeldatud kohaldamisalast (punkt 5) välja jäävad ained kõrvale jätta, liigitati IL-8 lutsiferaasikatsega 136 kemikaalist 113 positiivseks või negatiivseks ja 23 kemikaali puhul oli tulemus ebaselge ning IL-8 lutsiferaasikatse meetodi täpsus oli 89 % (101/113), tundlikkus 96 % (92/96) ja spetsiifilisus 53 % (9/17). Inimuuringute andmete alusel, millele on osutanud Urbisch *et al.* (7), liigitati IL-8 lutsiferaasikatsega 90 kemikaalist 76 positiivseks või negatiivseks ja 14 kemikaali puhul oli tulemus ebaselge ning meetodi täpsus oli 80 % (61/76), tundlikkus 93 % (54/58) ja spetsiifilisus 39 % (7/18). Kui kohaldamisalast välja jäävad ained kõrvale jätta, liigitati IL-8 lutsiferaasikatsega 84 kemikaalist 71 positiivseks või negatiivseks ja 13 kemikaali puhul oli tulemus ebaselge ning meetodi täpsus oli 86 % (61/71), tundlikkus 93 % (54/58) ja spetsiifilisus 54 % (7/13). IL-8 lutsiferaasikatses valenegatiivsete prognooside saamise tõenäosus on suurem vähesel määral kuni mõõdukalt nahka sensibiliseerivate (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1B) kemikaalide puhul ja väiksem siis, kui tegemist on tugevalt nahka sensibiliseeriva (ÜRO GHSi / CLP-määruse kohaselt alamkategooria 1A) kemikaaliga (6). Kokkuvõttes nähtub sellest teabest, et IL-8 lutsiferaasikatset saab kasutada naha sensibiliseerimise ohu kindlakstegemisel. Ainsa meetodina kasutatava IL-8 lutsiferaasikatsega saavutatav eespool nimetatud täpsus on siiski üksnes orienteeriv, sest katseandmeid tuleks vaadelda ühtse lähenemisviisi kontekstis koos muudest allikatest pärit teabega ja kooskõlas

▼**M8**

üldise sissejuhatuse punktide 8 ja 7 sätetega. Kui hinnatakse naha sensibiliseerimise katsemeetodeid, mille puhul ei kasutata katseloomi, tuleb lisaks meeles pidada, et LLNA ja muude loomkatsete tulemused ei pruugi täielikult kajastada kemikaali toimet inimesele.

4. Praeguse olemasoleva teabe põhjal on tõendatud, et IL-8 lutsiferaasikatse meetod on kohaldatav paljude uuritavate kemikaalide puhul, mis erinevad üksteisest orgaanilise funktsionaalrühma, toimemehhanismi, *in vivo* katsetega määratud nahka sensibiliseeriva toime tugevuse ja füüsikalis-keemiliste omaduste poolest (2, 6).

5. Kuigi kõnealuses IL-8 lutsiferaasikatses kasutatav lahusti on X-VIVO™ 15, võimaldab see katse anda õige hinnangu kemikaalide kohta, mille log K_{ow} > 3,5 ja vees lahustuvus on programmiga EPI Suite™ tehtud arvutuste kohaselt ligikaudu 100 μg/ml, ning tuvastada vees halvasti lahustuvaid nahka sensibiliseerivaid kemikaale tõhusamalt kui IL-8 lutsiferaasikatse, milles kasutatakse lahustina dimetüülsulfoksiidi (DMSO) (2). Ent kontsentratsioonil 20 mg/ml mittelahustuvate kemikaalide puhul saadavad negatiivsed tulemused võivad olla valenegatiivsed, kuna sellised kemikaalid ei lahustu X-VIVO™ 15-s. Seepärast tuleks kõnealuste kemikaalide puhul jätta negatiivsed tulemused arvesse võtmata. Valideerimisuuringus täheldati suurt valenegatiivsete tulemuste määra anhüdriidide puhul. Peale selle võidakse kasutatava rakuliini piiratud metaboliseerimisvõime (8) või katsetingimuste tõttu saada katses negatiivseid tulemusi ka prohapteenidega (ained, mis vajavad metaboolset aktiveerimist) ja prehapteenidega (ained, mis aktiveeruvad õhus oksüdeerumisel). Ehkki võimaliku pre- või prohapteeni puhul saadavate negatiivsete tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, oli IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas andmestikus esindatud ainete kohta tehtud õigete järelduste määr prehapteenide puhul 11/11, prohapteenide puhul 6/6 ja pre-/prohapteenide puhul 6/8 (2). Lähtuvalt pre- ja prohapteenide tuvastamiseks kasutatava kolme loomadega mitteseotud katsemeetodi (DPRA, KeratinoSens™ ja h-CLAT) hiljutisest põhjalikust analüüsist (9) ja tulenevalt asjaolust, et IL-8 lutsiferaasikatses kasutatav rakuliin THP-G8 on saadud h-CLATs kasutatavast rakuliinist THP-1, võib IL-8 lutsiferaasikatse meetod muude meetoditega kombineerituna aidata suurendada muudel kui loomkatsetel põhinevate meetodite tundlikkust pre- ja prohapteenide tuvastamisel. Seni uuritud pindaktiivsete ainetega on saadud (vale)positiivsed tulemused, seda olenemata nende liigist (nt katioonsed, anioonsed või mitteioonsed). Lisaks võivad lutsiferaasile segavat mõju avaldavad kemikaalid moonutada selle aktiivsust või mõõtmistulemusi ning seeläbi põhjustada näilist inhibitsiooni või tugevamat luminestsentsi (10). Näiteks on muude lutsiferaasipõhiste reportergeenikatsete puhul täheldatud, et fütoöstrogeenid, mis esinevad suuremas kontsentratsioonis kui 1 μM, mõjutavad luminestsentsisignaale lutsiferaasi reportergeeni üleaktiveerimise teel. Seepärast tuleb lutsiferaasi ekspressioonitaset, mis on mõõdetud suures kontsentratsioonis esineva fütoöstrogeeni või sellise ühendi juuresolekul, mille puhul kahtlustatakse fütoöstrogeeniga sarnast lutsiferaasi reportergeeni aktiveerivat toimet, hoolikalt analüüsida (11). Eespool kirjeldatust tulenevalt ei kuulu pindaktiivsed ained, anhüdriidid ja lutsiferaasile segavat mõju avaldavad kemikaalid käesoleva katsemeetodi kohaldamisalasse. Kui leidub andmeid, mille kohaselt IL-8 lutsiferaasikatset ei saa kasutada mõne muu konkreetse uuritavate kemikaalide rühma puhul, ei tohiks seda asjaomase konkreetse kemikaalirühma puhul kasutada.

6. Nagu eespool kirjeldatud, aitab IL-8 lutsiferaasikatse eristada naha sensibilisaatoreid kemikaalidest, mis nahka ei sensibiliseeri. Täiendavalt on vaja uurida seda, kas IL-8 lutsiferaasikatse tulemusi saab muudest allikatest pärit teabega kombineerituna kasutada toime tugevuse hindamisel; seda tuleks soovitatavalt teha inimuuringutest saadud andmete alusel.

▼**M8**

7. Mõisted on esitatud liites 3.1.

KATSE PÕHIMÕTE

8. IL-8 lutsiferaasikatses kasutatakse inimese monotsüütse leukeemia rakuliini THP-1, mis on pärit Ameerika Tüüpkultuuride Kollektsioonist (Manassas, VA, Ameerika Ühendriigid). Selle rakuliini baasil on Tohoku Ülikooli arsteteaduskonna dermatoloogiaosakonnas loodud IL-8 reporterrakuliin THP-G8, mis sisaldab oranži valgust tekitava püsiva lutsiferaasi (SLO) ja punast valgust tekitava püsiva lutsiferaasi (SLR) geene, mis on vastavalt IL-8 ja glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaasi (GAPDH) promootori kontrolli all (1). See võimaldab pärast kokkupuudet sensibiliseeriva kemikaaliga luminestsentskiirguse tuvastamise teel kvantitatiivselt mõõta lutsiferaasi geeni aktiveerumist IL-8 ja GAPDH aktiivsuse näitajana; selleks otstarbeks kasutatakse üldkasutatavaid valgust tekitavaid lutsiferaasi substraate.

9. Kahe värvuse tekitamist võimaldav katsesüsteem koosneb oranži valgust tekitavast lutsiferaasist (SLO; λ_{maks} = 580 nm) (12), mis võimaldab mõõta IL-8 promootorist sõltuvat geenikspressiooni, ja punast valgust tekitavast lutsiferaasist (SLR; λ_{maks} = 630 nm) (13), mis võimaldab mõõta sisemise kontrollina kasutatavat GAPDH promootorist sõltuvat geenikspressiooni. Jaanimardika D-lutsiferiin kiirgab nende kahe lutsiferaasiga reageerides eri värvi valgust ning tekkivat luminestsentskiirgust mõõdetakse üheaegselt üheetapilises reaktsioonis: selleks kasutatakse katsesegust lähtuva valguskiirguse lahutamist optilise filtri abil (14) (liide 3.2).

10. THP-G8 rakke töödeldakse 16 tunni jooksul uuritava kemikaaliga ning seejärel mõõdetakse lutsiferaasi SLO aktiivsus (SLO-LA), mis kajastab IL-8 promootori aktiivsust, ja lutsiferaasi SLR aktiivsus (SLR-LA), mis kajastab GAPDH promootori aktiivsust. Parema arusaadavuse huvides kasutatakse lühendite SLO-LA ja SLR-LA asemel vastavalt tähiseid IL8LA ja GAPLA. Tabelis 1 on esitatud ülevaade IL-8 lutsiferaasikatse puhul kasutatavatest lutsiferaasi aktiivsusega seotud mõistetest. Mõõdetud väärtuste põhjal arvutatakse järgmised näitajad: normaliseeritud IL8LA (nIL8LA), mida väljendatakse IL8LA ja GAPLA suhtarvuna; nIL8LA suurenemine (Ind-IL8LA), mida väljendatakse neljas uuritava kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkude paralleelproovis mõõdetud nIL8LA väärtuste aritmeetilise keskmise ja neljas töötlemata THP-G8 rakkude paralleelproovis mõõdetud nIL8LA väärtuste aritmeetilise keskmise suhtarvuna; GAPLA inhibeerimise määr (Inh-GAPLA), mida väljendatakse neljas uuritava kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkude paralleelproovis mõõdetud GAPLA väärtuste aritmeetilise keskmise ja neljas töötlemata THP-G8 rakkude paralleelproovis mõõdetud GAPLA väärtuste aritmeetilise keskmise suhtarvuna ning mida kasutatakse tsütotoksilisuse näitajana.

Tabel 1.

IL-8 lutsiferaasikatse puhul kasutatavad lutsiferaasi aktiivsusega seotud mõisted

Lühendid	Määratlus
GAPLA	Lutsiferaasi SLR aktiivsus, mis kajastab GAPDH promootori aktiivsust
IL8LA	Lutsiferaasi SLO aktiivsus, mis kajastab IL-8 promootori aktiivsust
nIL8LA	IL8LA: GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkudes: nIL8LA töötlemata rakkudes

▼**M8**

Lühendid	Määratlus
Inh-GAPLA	GAPLA kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkudes: GAPLA töötlemata rakkudes
CV05	Kemikaali vähim kontsentratsioon, mille juures Inh-GAPLA on < 0,05

11. Siin kirjeldatud IL-8 lutsiferaasikatse meetodiga sarnaste muudetud *in vitro* IL-8 lutsiferaasikatse meetodite valideerimise hõlbustamiseks on olemas tulemuslikkuse standardid (15), mis võimaldavad OECD katsejuhendit 442E selliste meetodite lisamiseks õigeaegselt muuta. OECD otsuse kohane andmete vastastikune tunnustamine on tagatud vaid sellise katsemeetodi puhul, mis on valideeritud kooskõlas tulemuslikkuse standarditega ning mille OECD on läbi vaadanud ja katsejuhendisse 442E lisanud (16).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

12. Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust ning kasutada selleks liites 3.3 loetletud kümmet pädevusainet kooskõlas *in vitro* meetodeid käsitleva hea tavaga (17). Lisaks peaksid meetodi kasutajad haldama reageerimisvõime kontrollimise käigus kogutud andmeid (vt punkt 15) ning positiivsete ja lahustiga/kandeainega kontrollidega saadud varasemaid andmeid (vt punktid 21–24) sisaldavat andmebaasi ning kontrollima nende andmete põhjal, kas katsetulemused on laboris aja möödudes jätkuvalt reprodutseeritavad.

KATSE KÄIK

13. IL-8 lutsiferaasikatse jaoks on olemas standardne töökord, mida tuleks katsemeetodi rakendamisel kasutada (18). Katset läbi viia soovivad laborid saavad soetada rekombinantse THP-G8 rakuliini Jaapanis Tottoris asuvastettevõttest GPC Lab. Co. Ltd., kui nad allkirjastavad OECD vormil esitatud tingimustele vastava materjali üleandmise lepingu. Järgmistes punktides on kirjeldatud katsemeetodi põhielemente ja katse käiku.

Rakkude ettevalmistamine

14. IL-8 lutsiferaasikatse tegemiseks tuleks kasutada THP-G8 rakuliini, mis on soetatud Jaapanis Tottoris asuvast ettevõttest GPC Lab. Co. Ltd. (vt punktid 8 ja 13). Pärast rakkude kättesaamist paljundatakse neid (2–4 passaaži) ja säilitatakse need külmutatult homogeense tüvikultuurina. Kõnealuse tüvikultuuri rakkude paljundamiseks võib neid kuni 12 korda ümber külvata või kasvatada neid kuni kuue nädala jooksul. Paljundamiseks kasutatakse söödet RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, antibiootikume / seentevastast ainet (0,85 % füsioloogilises lahuses 100 ühikut penitsilliin G-d milliliitri kohta, streptomütsiini kontsentratsioonis 100 µg/ml ja amfoteritsiin B-d kontsentratsioonis 0,25 µg/ml) (nt GIBCO, kataloginumber 15240-062), puromütsiini (nt CASi numbriga 58-58-2) kontsentratsioonis 0,15 µg/ml ja G418 (nt CASi numbriga 108321-42-2) kontsentratsioonis 300 µg/ml.

15. Enne rakkude kasutamist katses tuleks teha reageerimisvõime kontroll, et veenduda rakkude sobivuses. Kõnealune kontroll tuleks teha 1–2 nädalat pärast sulatamist või pärast 2–4 korda ümber külvamist ning kasutada selleks positiivse kontrollina 4-nitrobensüülbromiidi (4-NBB) (CASi nr: 100-11-8; puhtus ≥ 99 %) ja negatiivse kontrollina piimhapet (CASi nr: 50-21-5; puhtus ≥ 85 %). 4-NBB puhul peaks Ind-IL8LA alusel tuvastatav reaktsioon olema positiivne (Ind-IL8LA ≥ 1,4) ja piimhappe puhul negatiivne (Ind-IL8LA < 1,4). Katses kasutatakse üksnes reageerimisvõime kontrolli läbinud rakke. Reageerimisvõime kontroll tuleb teha vastavalt punktides 22–24 esitatud kirjeldusele.

▼M8

16. Katses kasutamiseks külvatakse THP-G8 rakud välja tihedusega 2–5 × 10^5 rakku/ml ning eelkasvatatakse neid rakukultuuripudelis 48–96 tundi. Katse päeval pestakse rakukultuuripudelist eemaldatud rakke söötmega RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, aga ei sisalda antibiootikume, ja rakud suspendeeritakse uuesti 10 % veiselooteseerumit sisaldavas antibiootikumideta söötmes RPMI-1640 tihedusel 1 × 10^6 rakku/ml. Seejärel jaotatakse rakud 50 µl kaupa 96-kannulise lamedapõhjalise plaadi kannudesse (nt Costar, katalooginumber 3603) (5 × 10^4 rakku kannu kohta).

Uuritava kemikaali ja kontrollainete ettevalmistamine

17. Uuritav kemikaal ja kontrollained valmistatakse ette katse tegemise päeval. IL-8 lutsiferaasikatse puhul lahustatakse uuritav kemikaal turul kättesaadavas seerumita söötmes X-VIVO™ 15 (Lonza, 04-418Q) lõppkontsentratsioonini 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 lisatakse mikrotsentrifuugi katsutis olevale 20 mg uuritavale kemikaalile (olenemata kemikaali lahustuvusest) kuni koguseni 1 ml. Seejärel segatakse lahust ägedalt keerissegistil ja loksutatakse 30 minutit rootori maksimumkiirusel 8 pööret minutis ümbritseva õhu temperatuuril umbes 20°C juures. Kui katsutisse jääb veel lahustumata tahket kemikaali, töödeldakse seda ultraheliga, kuni kemikaal on täielikult lahustunud või moodustab püsiva dispersiooni. Kui uuritav kemikaal on X-VIVO™ 15-s lahustuv, siis lahjendatakse lahust viis korda X-VIVO™ 15-ga ja kasutatakse saadud lahust X-VIVO™ 15-s lahustatud uuritava kemikaali põhilahusena (4 mg/ml). Kui uuritav kemikaal ei ole X-VIVO™ 15-s lahustuv, loksutatakse segu pöördloksutil veel vähemalt 30 minutit ning tsentrifuugitakse seejärel 5 minutit kiirusel 15000 pööret minutis (≈ 20 000 *g*); saadud supernatanti kasutatakse X-VIVO™ 15-s lahustatud uuritava kemikaali põhilahusena. Muu lahusti, näiteks DMSO, vee või söötme kasutamisel tuleks esitada sellekohane teaduslik põhjendus. Kemikaalide lahustamise korda on üksikasjalikult kirjeldatud liites 3.5. Punktides 18–23 kirjeldatud X-VIVO™ 15 lahused segatakse 96-kannulisele lamedapõhjalisele mustale plaadile kantud rakususpensiooniga (vt punkt 16) mahuvahekorras 1: 1.

18. Esimese analüüsitsükli puhul on eesmärk teha kindlaks tsütotoksilisuse avaldumise kontsentratsioon ja uurida kemikaali võimet nahka sensibiliseerida. X-VIVO™ 15-s lahustatud uuritava kemikaali põhilahusest tehakse 96-kannulisel katseplaadil (nt Costar, katalooginumber EW-01729-03) X-VIVO™ 15 abil rida kahekordseid lahjendusi (vt liide 3.5). Seejärel lisatakse 96-kannulisele lamedapõhjalisele mustale plaadile kantud 50 µl rakususpensioonile 50 µl lahjendatud lahust kannu kohta. Nii saadakse X-VIVO™ 15-s lahustuva uuritava kemikaali lõppkontsentratsioonid vahemikus 0,002–2 mg/ml (liide 3.5). Selliste uuritavate kemikaalide puhul, mis X-VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml ei lahustu, tehakse kindlaks ainult lahjendustegurid vahemikus 2–2^{10}, kuid uuritava kemikaali tegelikud lõppkontsentratsioonid ei ole teada ja sõltuvad uuritava kemikaali küllastuskontsentratsioonist X-VIVO™ 15-s valmistatud põhilahuses.

19. Järgnevates analüüsitsüklites (st teises, kolmandas ja neljandas tsüklis) valmistatakse põhilahus X-VIVO™ 15-s neli korda suurema kontsentratsiooniga, kui oli esimeses tsüklis kasutatud kontsentratsioon, mille juures rakkude eluvõimelisus oli läviväärtusest väiksem (CV05 – väiksem kontsentratsioon, mille juures Inh-GAPLA on < 0,05). Kui Inh-GAPLA ei lange alla 0,05 ka kõige suuremal esimeses analüüsitsüklis kasutatud kontsentratsioonil, valmistatakse põhilahus X-VIVO™ 15-s esimeses analüüsitsüklis kasutatud suurima kontsentratsiooniga. CV05-le vastava kontsentratsiooni arvutamiseks jagatakse esimeses analüüsitsüklis kasutatud põhilahuse kontsentratsioon CV05 puhul kasutatud lahendusteguriga X (lahjendustegur CV05 (X) – lahjendustegur, mida tuleb kasutada põhilahuse lahjendamiseks kontsentratsioonini CV05) (vt liide 3.5). Selliste uuritavate ainete puhul, mis kontsentratsioonil 20 mg/ml X-VIVOs ei lahustu, tehakse CV05 kindlaks nii, et põhilahuse kontsentratsioon korrutatakse teguriga 1/X. 2.–4. analüüsitsükli jaoks valmistatakse teine põhilahus kontsentratsiooniga 4 × CV05 (liide 3.5).

▼**M8**

20. Teisest põhilahusest valmistatakse X-VIVO™ 15-ga 96-kannulisel katseplaadil rida 1,5-kordseid lahjendusi. Seejärel lisatakse 96-kannulise lamedapõhjalise musta plaadi kannudesse kantud 50 µl rakususpensioonile 50 µl lahjendatud lahust kannu kohta. Iga uuritavat kemikaali tuleks igal kontsentratsioonil analüüsida neljas kannus. Järgnevalt segatakse proovid plaadiloksutil ja neid inkubeeritakse 37°C juures 5-protsendilise CO_2-sisaldusega atmosfääris 16 tundi. Seejärel mõõdetakse lutsiferaasi aktiivsus allpool kirjeldatud viisil.

21. Lahustiga kontrollina kasutatakse segu, mis sisaldab kannu kohta 50 µl X-VIVO™ 15 ja 50 µl rakususpensiooni 10 % veiselooteseerumit sisaldavas RPMI-1640-s.

22. Soovitatav positiivse kontrolli aine on 4-NBB. 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutisse viiakse 20 mg 4-NBBd ning lisatakse X-VIVO™ 15 kuni koguseni 1 ml. Lahust segatakse ägedalt keerissegistil ja loksutatakse vähemalt 30 minutit jooksul rootori maksimumkiirusel 8 pööret minutis. Pärast 5 minutit tsentrifuugimist kiirendusega 20000 *g* lahjendatakse supernatanti X-VIVO™ 15-ga neli korda ning 500 µl lahjendatud supernatanti kantakse 96-kannulise katseplaadi ühte kannu. Lahjendatud supernatanti lahjendatakse X-VIVO™ 15-ga uuesti kaks ja neli korda ning igast saadud lahusest lisatakse 50 µl 96-kannulise lamedapõhjalise musta plaadi kannudesse, mis sisaldavad 50 µl THP-G8 rakkude suspensiooni (liide 3.6). Positiivset kontrolli tuleks igal kontsentratsioonil analüüsida neljas kannus. Plaati loksutatakse plaadiloksutil ja inkubeeritakse CO_2 inkubaatoris 37°C juures 5-protsendilise CO_2-sisaldusega atmosfääris 16 tundi. Seejärel mõõdetakse punktis 29 kirjeldatud viisil lutsiferaasi aktiivsus.

23. Soovitatav negatiivse kontrolli aine on piimhape. 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutisse viiakse 20 mg piimhapet ning lisatakse X-VIVO™ 15 kuni koguseni 1 ml (20 mg/ml). Piimhappelahust kontsentratsiooniga 20 mg/ml lahjendatakse X-VIVO™ 15-ga veel viis korda (4 mg/ml); 500 µl saadud piimhappelahusest kontsentratsiooniga 4 mg/ml kantakse 96-kannulise katseplaadi ühte kannu. Seda lahust lahjendatakse X-VIVO™ 15-ga kaks korda ja seejärel uuesti kaks korda, et saada lahused kontsentratsiooniga 2 mg/ml ja 1 mg/ml. Igast saadud kolmest lahusest ja kandeainega kontrollist (X-VIVO™ 15) lisatakse 50 µl 96-kannulise lamedapõhjalise musta plaadi kannudesse, mis sisaldavad 50 µl THP-G8 rakkude suspensiooni. Negatiivset kontrolli analüüsitakse igal kontsentratsioonil neljas kannus. Plaati loksutatakse plaadiloksutil ja inkubeeritakse CO_2 inkubaatoris 37°C juures 5-protsendilise CO_2-sisaldusega atmosfääris 16 tundi. Seejärel mõõdetakse punktis 29 kirjeldatud viisil lutsiferaasi aktiivsus.

24. Võib kasutada ka mõnda muud sobivat positiivset või negatiivset kontrolli, kui on olemas varasemad andmed, mis võimaldavad kindlaks määrata võrreldavad analüüsitsükli nõuetekohasuse kriteeriumid.

25. Tuleks jälgida, et lenduvad uuritavad kemikaalid ei aurustuks, ning hoida ära kannudevahelist uuritava kemikaaliga ristsaastumist. Selleks võib plaadi enne uuritava kemikaaliga inkubeerimist näiteks tihedalt kinni katta.

26. Uuritavate kemikaalide ja lahustiga kontrolli puhul on positiivse või negatiivse prognoosi saamiseks vaja läbi viia 2–4 analüüsitsüklit (vt tabel 2). Iga analüüsitsükkel viiakse läbi eri päeval; igas tsüklis kasutatakse X-VIVO™ 15-s lahustatud uuritava kemikaali värsket põhilahust ja sõltumatult kogutud rakke. Rakud võivad pärineda samast passaažist.

▼M8

Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine

27. Luminestsentskiirgust mõõdetakse 96-kannulise mikroplaadi jaoks ette nähtud luminomeetriga, mis on varustatud optiliste filtritega – nt seadmega Phelios (ATTO, Tokyo, Jaapan) või Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Saksamaa) või ARVO-seeria seadmega (PerkinElmer, Waltham, MA, Ameerika Ühendriigid). Reprodutseeritavuse tagamiseks tuleb luminomeeter iga katse eel kalibreerida (19). Kalibreerimiseks on saadaval oranži või punast valgust tekitavad rekombinantsed lutsiferaasid.

28. Igasse kemikaaliga töödeldud või töötlemata rakususpensiooni sisaldavasse plaadi kannu lisatakse 100 µl lutsiferaasikatse eelsoojendatud reaktiivi Tripluc® (Tripluc). Plaati loksutatakse 10 minutit ümbritseva õhu temperatuuril umbes 20°C juures. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks asetatakse plaat luminomeetrisse. Bioluminestsentsi mõõdetakse 3 sekundit ilma optilise filtrita (F0) ja 3 sekundit optilise filtriga (F1). Kui kasutatakse muid seadeid, mis võivad sõltuda näiteks kasutatava luminomeetri mudelist, tuleks seda põhjendada.

29. Mõõdetud väärtuste põhjal arvutatakse soovitud näitajad iga kontsentratsiooni puhul, nt IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, IL8LA keskväärtus ± standardhälve, GAPLA keskväärtus ± standardhälve, nIL8LA keskväärtus ± standardhälve, Ind-IL8LA keskväärtus ± standardhälve, Inh-GAPLA keskväärtus ± standardhälve ja Ind-IL8LA usaldusvahemik usaldusnivool 95 %. Käesolevas punktis nimetatud näitajate määratlused on esitatud liidetes 3.1 ja 3.4.

30. Mitme värvuse tuvastamist võimaldavate reporterkatsete puhul kasutatakse mõõtmise eel eri värvuste lahutamiseks üldjuhul selliseid detektorseadmeid (luminomeeter ja plaadilugemisseade), mis on varustatud optiliste filtritega, nt teravapiiriliste madal- või kõrgpääsufiltrite või ribapääsufiltritega. Enne katset tuleks määrata filtrite läbilaskvustegurid iga bioluminestsentssignaali värvuse jaoks vastavalt liitele 3.2.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete hindamine

31. Positiivseks/negatiivseks liigitamise otsus tehakse igas analüüsitsüklis järgmiste kriteeriumide alusel:

— IL-8 lutsiferaasikatsel põhinev prognoos tunnistatakse positiivseks, kui uuritava kemikaaliga saadud Ind-IL8LA väärtus on ≥ 1,4 ja Ind-IL8LAd iseloomustava usaldusnivoole 95 % vastava usaldusvahemiku alampiir on ≥ 1,0;

— IL-8 lutsiferaasikatsel põhinev prognoos tunnistatakse negatiivseks, kui uuritava kemikaaliga saadud Ind-IL8LA väärtus on < 1,4 ja/või Ind-IL8LAd iseloomustava usaldusnivoole 95 % vastava usaldusvahemiku alampiir on < 1,0.

Prognoosimudel

32. Uuritav kemikaal, mille puhul on esimese, teise, kolmanda ja neljanda analüüsitsükli lõikes saadud kaks positiivset tulemust, tunnistatakse positiivseks; uuritav kemikaal, mille puhul on esimese, teise, kolmanda ja neljanda analüüsitsükli lõikes saadud kolm negatiivset tulemust, tunnistatakse arvatavalt negatiivseks (tabel 2). Arvatavalt negatiivsete kemikaalide seas tunnistatakse negatiivseks sellised kemikaalid, mis lahustuvad X-VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml; kemikaalid, mis X-VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml ei lahustu, tuleks kõrvale jätta (joonis 1).

▼**M8**

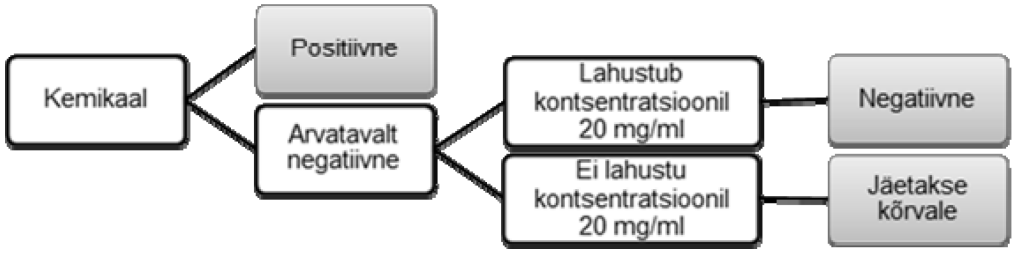
Tabel 2.

Positiivsete ja arvatavalt negatiivsete kemikaalide kindlakstegemise kriteeriumid

1. tsükkel	2. tsükkel	3. tsükkel	4. tsükkel	Lõplik prognoos
Positiivne	Positiivne	—	—	Positiivne
	Negatiivne	Positiivne	—	Positiivne
		Negatiivne	Positiivne	Positiivne
			Negatiivne	Arvatavalt negatiivne
Negatiivne	Positiivne	Positiivne	—	Positiivne
		Negatiivne	Positiivne	Positiivne
			Negatiivne	Arvatavalt negatiivne
	Negatiivne	Positiivne	Positiivne	Positiivne
			Negatiivne	Arvatavalt negatiivne
		Negatiivne	—	Arvatavalt negatiivne

Joonis 1.

Prognoosimudel lõppotsuse tegemiseks



Nõuetekohasuse kriteeriumid

33. IL-8 lutsiferaasikatse puhul peaksid olema täidetud järgmised nõuetekohasuse kriteeriumid.

— Ind-IL8LA peaks olema igas analüüsitsüklis vähemalt ühel positiivse kontrolli (4-NBB) kontsentratsioonil suurem kui 5,0.

— Ind-IL8LA peaks olema igas analüüsitsüklis kõikidel negatiivse kontrolli (piimhape) kontsentratsioonidel väiksem kui 1,4.

— Andmed, mis on saadud plaatidelt, kus rakke ja Triplucit sisaldavates ilma kemikaalita kontrollkannudes täheldatud GAPLA väärtus on alla viie korra suurem kui GAPLA väärtus kannus, mis sisaldab ainult katsesöödet (kannu kohta 50 µl söödet RPMI-1640, mis sisaldab 10 % veiselooteseerumit, ja 50 µl X-VIVO^{TM} 15), tuleks jätta arvesse võtmata.

— Andmed, mis on saadud plaatidelt, kus uuritava või kontrollkemikaaliga saadud Inh-GAPLA väärtus on kõigil kontsentratsioonidel väiksem kui 0,05, tuleks jätta arvesse võtmata. Sellisel juhul tuleks esimest katset korrata nii, et korduskatses kasutatakse suurima lõppkontsentratsioonina eelmises katses kasutatud vähimat lõppkontsentratsiooni.

▼M8

Katseprotokoll

34. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritavad kemikaalid

Ühest koostisosast koosnev aine:

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;

— füüsiline välimus, lahustuvus vees, molekulmass ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);

— lahustuvus X-VIVO™ 15-s. X-VIVO™ 15-s mittelahustuvate kemikaalide puhul teave selle kohta, kas pärast tsentrifuugimist on näha sadet või hõljumit;

— kasutatud kontsentratsioon(id);

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus juhul, kui ei kasutatud X-VIVO™ 15.

Mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt näiteks koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), puhtusest, kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest kättesaadavatest andmetest (vt eespool);

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— teadaoleva koostisega segu/polümeeri puhul molekulmass või näiline molekulmass või muu uuringu tegemiseks asjakohane teave;

— vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);

— lahustuvus X-VIVO™ 15-s. X-VIVO™ 15-s mittelahustuvate kemikaalide puhul teave selle kohta, kas pärast tsentrifuugimist on näha sadet või hõljumit;

— kasutatud kontsentratsioon(id);

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti/kandeaine valimise põhjendus juhul, kui ei kasutatud X-VIVO™ 15.

Kontrollid

Positiivne kontroll:

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem ja/või muu identimisteave;

— füüsiline välimus, lahustuvus vees, molekulmass ja muud asjakohased kättesaadavad andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

▼**M8**

— puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— vajaduse korral teave töötlemise kohta enne katset (nt soojendamine, peenestamine);

— kasutatud kontsentratsioon(id);

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— vajaduse korral viide varasematele positiivse kontrolliga saadud tulemustele, millest nähtub vastavus asjakohastele nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Negatiivne kontroll:

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus(ed) ja CASi number/numbrid ja/või muu identimisteave;

— puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

— asjaomases katsejuhendis nimetamata negatiivsete kontrolli aine kasutamisel kättesaadav teave selle füüsilise välimuse, molekulmassi ja muude asjakohaste füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— kättesaadav teave säilitamistingimuste ja püsivuse kohta;

— iga uuritava kemikaali puhul lahusti valimise põhjendus.

Katsetingimused:

— sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

— kasutatud katsemeetodi kirjeldus;

— kasutatud rakuliin, selle säilitamistingimused ning päritolu (nt asutus, kellelt rakud saadi);

— veiselooteseerumi partiinumber ja päritolu, tarnija nimi, 96-kannulise lamedapõhjalise musta plaadi partiinumber ja reaktiivi Tripluc partiinumber;

— passaaži number ja rakkude tihedus katses kasutamisel;

— enne katset rakkude külvamisel kasutatud rakuloendusmeetod ning võetud meetmed, millega tagati rakkude homogeenne jaotus;

— kasutatud luminomeeter (nt mudel), sealhulgas seadme seaded, kasutatud lutsiferaasisubstraat ja liites 3.2 kirjeldatud kontrollkatsel põhinev tõendus asjakohaste luminestsentskiirguse mõõtmiste läbiviimise kohta;

— laboris katse tegemiseks vajaliku pädevuse tõendamiseks (nt pädevusainetega katsete tegemiseks) kasutatud meetod või katsemeetodiga saadud tulemuste pikaajalise reprodutseeritavuse tõendamiseks kasutatud meetod.

Katse käik:

— proovide ja analüüsitsüklite arv;

— uuritava kemikaali kontsentratsioonid, lisamisviis ja kasutatud kokkupuuteaeg (kui erineb soovitatust);

▼**M8**

— kasutatud hindamis- ja otsustamiskriteeriumide kirjeldus;

— kasutatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kirjeldus;

— kõikide katse käigus tehtud muudatuste kirjeldus.

Tulemused:

— mõõdetud IL8LA ja GAPLA väärtused;

— arvutatud nIL8LA, Ind-IL8LA ja Inh-GAPLA väärtused;

— Ind-IL8LA usaldusvahemik usaldusnivool 95 %;

— graafik, millel on kujutatud lutsiferaasi aktiivsuse ja rakkude eluvõimelisuse kontsentratsioonist sõltuvuse kõverad;

— vajaduse korral mis tahes muude asjakohaste vaatlusandmete kirjeldus.

Tulemuste arutelu:

— IL-8 lutsiferaasikatsega saadud tulemuste arutelu;

— katse tulemuste hindamine ühtse lähenemisviisi kontekstis, kui muu asjakohane teave on kättesaadav.

Järeldused

KIRJANDUS

(1) Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., ja Aiba, S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol. Sci.* 124: 359–369.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267. ENV/JM/MONO(2017)19. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258. ENV/JM/MONO(2017)20. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016). Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 256. ENV/JM/MONO(2016)29. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natsch, A., van Loveren, H., ja Ezendam, J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69: 371–379.

(6) Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., ja Aiba, S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29: 1816–1830.

▼**M8**

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., *et al.* (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71: 337–351.

(8) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., ja Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *ATLA* 38: 275–284.

(9) Patlewicz, G., Casati, S., Basketter, D. A., Asturiol, D., Roberts, D. W., Lepoittevin, J.-P., Worth, A., ja Aschberger, K. (2016). Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 82: 147–155.

(10) Thorne, N., Inglese, J., ja Auld, D. S. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem. Biol.* 17: 646–657.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Publishing, Pariis. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani, V., Uchida, A., Suenaga, N., Ryufuku, M., ja Ohmiya, Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:1286–1291.

(13) Viviani, V. R., Bechara, E. J., ja Ohmiya, Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38: 8271–8279.

(14) Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., Enomoto, T., Asakawa, A., Kubota, H., Ikeda, M., ja Ohmiya, Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38: 891–894.

(15) OECD (2017). Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. Avaldamisel. OECD, Pariis, Prantsusmaa.

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Pariis, Prantsusmaa.

(17) OECD (2018). Draft Guidance Document on Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol. Kättesaadav aadressil http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa, K., Ichino, Y., Kumata, S., Nakajima, Y., Hiraishi, Y., Kato, D., Viviani, V. R., ja Ohmiya, Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem. Photobiol.* 86: 1046–1049.

▼**M8**

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Pariis, Prantsusmaa.

(21) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Kuues, täiendatud väljaanne. United Nations Publications, New York ja Genf. ISBN: 978-92-1-117006-1. Kättesaadav aadressil http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼**M8**

Liide 3.1

MÕISTED

Aine – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisaainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

Analüüsitsükkel – ühe või mitme uuritava kemikaali analüüsimine lahustiga/-kandeainega kontrolli ja positiivse kontrolliga paralleelselt.

Asjakohasus – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuivõrd katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (16).

CV05 – rakkude eluvõimelisu se tasemes kajastuv näitaja ehk vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaali toimel avalduv Inh-GAPLA on väiksem kui 0,05.

FInSLO-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale Ind-IL8LA. Mõiste Ind-IL8LA määratlus on esitatud allpool.

GAPLA – punast valgust tekitava püsiva lutsiferaasi (SLR) (λ_{maks} = 630 nm) aktiivsus, mida reguleerib GAPDH promootor ning mis kajastab rakkude eluvõimelisust ja eluvõimeliste rakkude arvu.

II-SLR-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale Inh-GAPLA. Mõiste Inh-GAPLA määratlus on esitatud allpool.

IL-8 (interleukiin 8) – endoteelirakkude, fibroblastide, keratinotsüütide, makrofaagide ja monotsüütide toodetav tsütokiin, mis põhjustab neutrofiilide ja T-lümfotsüütide kemotaksist.

IL8LA – oranži valgust tekitava püsiva lutsiferaasi (SLO) (λ_{maks} = 580 nm) aktiivsus, mida reguleerib IL-8 promootor.

Ind-IL8LA – nIL8LA suurenemine kordades. Selle arvutamiseks jagatakse kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkude puhul täheldatud nIL8LA väärtus töötlemata THP-G8 rakkude puhul täheldatud nIL8LA väärtusega ning see näitab, mil määral kemikaal suurendab IL-8 promootori aktiivsust.

Induktsiooni alampiir (MIT) – väiksem kontsentratsioon, mille juures kemikaal vastab positiivsuse kriteeriumidele.

Inh-GAPLA – GAPLA inhibeerimise määr. Selle arvutamiseks jagatakse kemikaaliga töödeldud THP-G8 rakkude puhul täheldatud GAPLA väärtus töötlemata THP-G8 rakkude puhul täheldatud GAPLA väärtusega ning see näitab kemikaali tsütotoksilisust.

Kahjuliku toime rada – sündmuste ahel alates sihtkemikaali või rühma sarnaste kemikaalide keemilisest struktuurist sõltuvast käivitavast molekulaarsest sündmusest kuni vaadeldava toime avaldumiseni *in vivo* (20).

Katsete tegemist ja hindamist käsitlev ühtne lähenemisviis – struktureeritud lähenemisviis, mida kasutatakse kemikaali või rühma kemikaalide ohtlikkuse tuvastamiseks (võimalik toime), ohu kirjeldamiseks (toime tugevus) ja/või ohutuse hindamiseks (võimalik toime / toime tugevus ja kokkupuude) ning mille raames lõimitakse strateegiliselt ja kaalutakse läbi kõik asjakohased andmed võimalikku ohtu ja/või riski ja/või täiendavate sihipäraste ja seega minimaalses ulatuses katsete tegemise vajadust käsitleva regulatiivse otsuse tegemiseks.

▼M8

Kemikaal – aine või segu.

Lahustiga/kandeainega kontroll – töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente peale uuritava kemikaali, sealhulgas lahustit/kandeainet. Selle abil tehakse kindlaks lähtetase samas lahustis/kandeaines lahustatud või püsiva dispersiooni moodustanud uuritava kemikaaliga töödeldud proovide jaoks. Kui sellist töötlemata proovi hinnatakse paralleelselt söötmega kontrolliga, võimaldab see ühtlasi kindlaks teha, kas lahusti/kandeaine mõjutab katsesüsteemi.

Mitmest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitmest koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitmest koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

nIL8LA – IL-8 promootori aktiivsust kajastav lutsiferaasi SLO aktiivsus (IL8LA), mis on normaliseeritud GAPDH promootori aktiivsust kajastava lutsiferaasi SLR aktiivsuse (GAPLA) suhtes. Sellega väljendatakse IL-8 promootori aktiivsust pärast rakkude eluvõimelisuse või rakkude arvu arvessevõtmist.

nSLO-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale nIL8LA. Mõiste nIL8LA määratlus on esitatud eespool.

Nõuetekohane katsemeetod – katsemeetod, mille asjakohasust ja usaldusväärsust konkreetse eesmärgi puhul peetakse piisavaks ning mis rajaneb teaduslikult usaldusväärsetel põhimõtetel. Katsemeetod ei ole kunagi nõuetekohane absoluutses tähenduses, vaid üksnes seoses teatud kindla eesmärgiga (29).

Ohtlikkus – mõjurit või olukorda iseloomustav omadus, millest võib tuleneda kahjulik toime, kui organism, süsteem või (alam)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Pindaktiivne aine – detergent või muu aine, mis võib vähendada vedeliku pindpinevust ja võimaldab sellel vahutada või tungida tahkesse ainesse; sama mis märgav aine (katsejuhend nr 437).

Positiivne kontroll – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

Prehapteenid – kemikaalid, mis muutuvad sensibilisaatoriks abiootilise muundumise teel.

Prohapteenid – kemikaalid, mis vajavad nahka sensibiliseeriva toime tekkimiseks ensümaatilist aktiveerimist.

Segu – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

SLO-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale IL8LA. Mõiste IL8LA määratlus on esitatud eespool.

SLR-LA – IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas valideerimisaruandes ja varasemates väljaannetes kasutatud lühend, millega osutatakse näitajale GAPLA. Mõiste GAPLA määratlus on esitatud eespool.

▼M8

Spetsiifilisus – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (16).

THP-G8 – IL-8 lutsiferaasikatses kasutatav IL-8 reporterrakuliin. Inimese makrofaagilaadsete rakkude liin THP-1, millesse on transfekteeritud lutsiferaaside SLO ja SLR geenid, mis on vastavalt IL-8 ja GAPDH promootori kontrolli all.

Tundlikkus – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud uuritavate kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (16).

Täpsus – katsetulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (16).

Usaldusväärsus – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus ning laborisisene korratavus (16).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Ühest koostisosast koosnev aine – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem (ÜRO GHS) – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavitustähiseid nagu piktogrammid, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (21).

▼**M8**

Liide 3.2

LUTSIFERAASI AKTIIVSUSE MÕÕTMISE PÕHIMÕTE NING SLO JA SLR-I PUHUL KOHALDATAVATE OPTILISE FILTRI LÄBILASKVUSTEGURITE KINDLAKSTEGEMINE

Mitme reporteriga katsesüsteemi Tripluc on võimalik kasutada mitme värvuse tuvastamist võimaldava mikroplaatide jaoks ette nähtud luminomeetriga, mille saab varustada optilise filtriga (nt Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Mõõtmiseks kasutatav optiline filter on madal- või kõrgpääsufilter piirlainepikkusega 600–620 nm või ribapääsufilter lainepikkusele 600–700 nm.

Lutsiferaaside tekitatava kahe värvuse mõõtmine optilise filtri abil

Selles näites kasutatakse luminomeetrit Phelios AB-2350 (ATTO). See luminomeeter on varustatud 600 nm madalpääsufiltriga (R60, HOYA Co., filter 1), mis võimaldab eristada SLO (λ_{maks} = 580 nm) ja SLRi (λ_{maks} = 630 nm) põhjustatud luminestsentsi.

600 nm madalpääsufiltri läbilaskvustegurite kindlakstegemiseks kasutatakse puhastatud lutsiferaase SLO ja SLR ning i) mõõdetakse SLO ja SLRi põhjustatud bioluminestsentsi tugevus ilma filtrita (F0), ii) mõõdetakse SLO ja SLRi põhjustatud, 600 nm madalpääsufiltri (filter 1) läbinud bioluminestsentskiirguse tugevus ja iii) arvutatakse allpool loetletud 600 nm madalpääsufiltri läbilaskvustegurid SLO ja SLRi puhul.

Läbilaskvustegurid		Lühend	Määratlus
SLO	Filter 1: läbilaskvustegur	$=\kappa O_{R60}$	Filtri läbilaskvustegur SLO puhul
SLR	Filter 1: läbilaskvustegur	κR_{R60}	Filtri läbilaskvustegur SLRi puhul

Kui valida katseproovis SLO ja SLRi põhjustatud luminestsentsi tugevuse tähisteks vastavalt O ja R, siis on i) filtri puudumisel täheldatav kogu optilist spektrit hõlmava valguse tugevus F0 ja ii) 600 nm madalpääsufiltri (filter 1) läbinud valguse tugevus F1 kirjeldatavad järgmiste valemitega.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Need valemid võib esitada ka järgmisel kujul:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Seejärel saab arvutatud läbilaskvustegurite (κO_{R60} ja κR_{R60}) ning mõõdetud F0 ja F1 väärtuste abil leida O ja Ri väärtused järgmise valemiga:.

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼M8

Läbilaskvusteguri kindlakstegemiseks kasutatavad materjalid ja meetodid

1) *Reaktiivid*

Puhastatud eraldi lutsiferaasid:

lüofiliseeritud puhastatud SLO

lüofiliseeritud puhastatud SLR

(valideerimisuuringu jaoks hangiti need koos rakuliiniga THP-G8 Jaapanis Tottoris asuvast ettevõttest GPC Lab. Co. Ltd.)

Katsereaktiiv:

lutsiferaasikatse reaktiiv Tripluc® (nt ettevõttest TOYOBO; kataloginumber MRA-301)

Sööde: lutsiferaasikatse sööde (30 ml, säilitatakse temperatuuril 2–8 °C)

Reaktiiv	Konts.	Lõppkonts. söötmes	Vajalik kogus
RPMI-1640	—	—	27 ml
Veiselooteseerum	—	10 %	3 ml

2) *Ensüümilahuse valmistamine*

Lüofiliseeritud puhastatud lutsiferaasi lahustamiseks katsutis lisatakse sellele 200 µl 10–100 mM Tris/HCl-i või Hepes/HCl-i (pH 7,5–8,0), mis sisaldab 10 % glütserooli massiühikutes ruumalaühiku kohta. Ensüümilahus jaotatakse 10 µl alikvootidena ühekordsetesse 1,5 ml katsutitesse ja säilitatakse sügavkülmikus temperatuuril -80 °C. Külmutatud ensüümilahus on kasutatav kuni kuue kuu jooksul. Kasutamisel lisatakse igasse ensüümilahust (lahjendatud ensüümilahust) sisaldavasse katsutisse 1 ml lutsiferaasikatse söödet (10 % veiselooteseerumit sisaldav RPMI-1640) ja inaktiveerumise takistamiseks hoitakse katsuteid jääl.

3) *Bioluminestsentsi mõõtmine*

Lutsiferaasikatse reaktiiv Tripluc® sulatatakse ja seda hoitakse toatemperatuuril veevannis või ümbritseva õhu temperatuuril. Luminomeeter lülitatakse sisse 30 minutit enne mõõtmise algust, et fotokordisti jõuaks stabiliseeruda. 100 µl lahjendatud ensüümilahust kantakse 96-kannulisele mustale lamedapõhjalisele plaadile (SLO proovid kannudesse B1, B2 ja B3, SLRi proovid kannudesse D1, D2, ja D3). Seejärel kantakse igasse ensüümilahust sisaldavasse plaadi kannu pipetiga 100 µl eelsoojendatud Triplucit. Plaati loksutatakse plaadiloksutil toatemperatuuril (umbes 25 °C) 10 minutit. Vajaduse korral kõrvaldatakse kannudes olevast lahusest mullid. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks asetatakse plaat luminomeetrisse. Bioluminestsentsi mõõdetakse 3 sekundit ilma optilise filtrita (F0) ja 3 sekundit optilise filtriga (F1).

Optilise filtri läbilaskvustegur arvutatakse vastavalt järgmistele valemitele.

Läbilaskvustegur (SLO (κO_{R60})) = (B1/F1 + B2/F1 + B3/F1): (B1/F0 + B2/F0 + B3/F0)

▼**M8**

Läbilaskvustegur (SLR (κR_{R60})) = (D1/F1 + D2/F1 + D3/F1): (D1/F0 + D2/F0 + D3/F0)

Arvutatud läbilaskvustegureid kasutatakse kõigi sama luminomeetriga tehtavate mõõtmiste puhul.

Seadmete kvaliteedi kontrollimine

Tuleks kasutada IL-8 lutsiferaasikatset käsitlevas katse-eeskirjas kirjeldatud korda (18).

▼**M8**

Liide 3.3

PÄDEVUSAINED

Enne katsemeetodi B.71 juurde kuuluvas käesolevas liites kirjeldatud meetodi rutiinset kasutamist tuleks tõendada labori tehnilist pädevust. Selleks tuleks IL-8 lutsiferaasikatses saada tabelis 1 esitatud soovitatava üheksa aine puhul eeldatavale tulemusele vastav prognoos ning üheksast pädevusainest vähemalt kaheksa puhul väärtused, mis jäävad asjaomasesse võrdlusvahemikku (pädevusained on valitud nii, et nende puhul oleksid esindatud naha sensibiliseerimise ohuga seotud eri reaktsioonid). Peale selle on valikukriteeriumidena võetud arvesse ainete kaubanduslikku kättesaadavust, kvaliteetsete *in vivo* võrdlusandmete olemasolu ja IL-8 lutsiferaasikatsega saadud kvaliteetsete *in vitro* andmete olemasolu. Lisaks on IL-8 lutsiferaasikatse kohta olemas avaldatud võrdlusandmed (1, 6).

Tabel 1.

IL-8 lutsiferaasikatse puhul tehnilise pädevuse tõendamiseks soovitatavad ained

Pädevusained	CASi nr	Olek	Lahustuvus X-VIVO15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml	*In vivo* toime prognoos ([1])	IL-8 lutsiferaasikatse kohane prognoos ([2])	Võrdlusvahemik **(µg/ml)** ([3])	
						CV_{05} ([4])	IL-8 lutsiferaasikatse kohane MIT ([5])
2,4-dinitroklorobenseen	97-00-7	Tahkis	Ei lahustu	Sensibilisaator (äärmiselt tugev)	Positiivne	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehüüd	50-00-0	Vedelik	Lahustub	Sensibilisaator (tugev)	Positiivne	9–30	4–9
2-merkaptobensotiasool	149-30-4	Tahkis	Ei lahustu	Sensibilisaator (mõõdukas)	Positiivne	250–290	60–250
Etüleendiamiin	107-15-3	Vedelik	Lahustub	Sensibilisaator (mõõdukas)	Positiivne	500–700	0,1–0,4
Etüleenglükooldimetakrülaat	97-90-5	Vedelik	Ei lahustu	Sensibilisaator (nõrk)	Positiivne	> 2000	0,04–0,1
4-allüülanisool (estragool)	140-67-0	Vedelik	Ei lahustu	Sensibilisaator (nõrk)	Positiivne	> 2000	0,01–0,07
Streptomütsiinsulfaat	3810-74-0	Tahkis	Lahustub	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	> 2000	> 2000
Glütserool	56-81-5	Vedelik	Lahustub	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	> 2000	> 2000
Isopropanool	67-63-0	Vedelik	Lahustub	Sensibiliseeriva toimeta	Negatiivne	> 2000	> 2000

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber.
([1]) *In vivo* toime tugevuse väljendamisel on lähtutud ECETOCi soovitatud kriteeriumidest (19).
([2]) Varasemate katsete andmete põhjal (1, 6).
([3]) CV_{05} ja IL-8 lutsiferaasikatse kohase MIT arvutamiseks kasutati programmiga EPI Suite™ saadud vees lahustuvuse andmeid.
([4]) CV_{05} – vähim kontsentratsioon, mille juures kemikaali toimel avalduv Inh-GAPLA on väiksem kui 0,05.
([5]) MIT – väiksem kontsentratsioon, mille juures kemikaal vastab positiivsuse kriteeriumidele.

▼M8

Liide 3.4

INDEKSID JA HINDAMISKRITEERIUMID

nIL8LA (nSLO-LA)

IL8LA (SLO-LA) ja GAPLA (SLR-LA) puhul tehakse mõõtmisi j-ndas analüüsitsüklis (j = 1–4) i-ndal kontsentratsioonil (i = 0–11). Normaliseeritud IL8LA tähis on nIL8LA (nSLO-LA) ja selle määratlus on järgmine: .

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

See on käesoleva katsemeetodi puhul kasutatav lähtesuurus.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Ind-IL8LA on käesoleva katsemeetodi puhul peamine näitaja, mis väljendab nIL8LA (nSLO-LA) keskmise väärtuse suurenemist kordades konkreetses analüüsitsüklis i-ndal kontsentratsioonil võrreldуna sama näitaja väärtusega nullkontsentratsioonil. Kõnealune suhe on esitatav järgmise valemiga:

$$\text{Ind} - \text{IL8LA}_i = \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{0j}\right\}$$

Juhtlabori ettepaneku kohaselt vastab uuritava kemikaali puhul positiivsele tulemusele väärtus 1,4. Nimetatud väärtus põhineb juhtlabori varasemate katseandmete analüüsil. Andmehalduse töörühm on kasutanud seda väärtust valideerimisuuringu kõigis etappides. Nagu valemist nähtub, on katse esmane tulemusnäitaja Ind-IL8LA kahe aritmeetilise keskmise suhtarv.

Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % ($CI_{95\ \%}$)

Kõnealuse esmase mõõdetava tulemusnäitaja kordustäpsuse hindamiseks saab leida nimetatud suhtarvul põhineva usaldusnivoole 95 % vastava usaldusvahemiku ($CI_{95\ \%}$). Kui $CI_{95\ \%}$ alampiir on ≥ 1, siis see näitab, et kontsentratsioonil nr i on nIL8LA oluliselt suurem kui lahustiga kontrolli puhul. $CI_{95\ \%}$ leidmiseks on mitu võimalust. Valideerimisuuringus kasutatud meetod põhineb Fielleri teoreemil. Selle teoreemi järgi leitakse usaldusvahemik usaldusnivool 95 % valemiga

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

kus .

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j \text{nIL8LA}_{0j}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

on keskse t-jaotuse 97,5-protsentiil vabadusastmete arvu ν puhul, kus

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA on konkreetses analüüsitsüklis i-ndal kontsentratsioonil täheldatava GAPLA (SLR-LA) keskväärtuse ja lahustiga kontrolli puhul täheldatava sama näitaja keskväärtuse suhtarv ning see on esitatav järgmisel kujul:

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

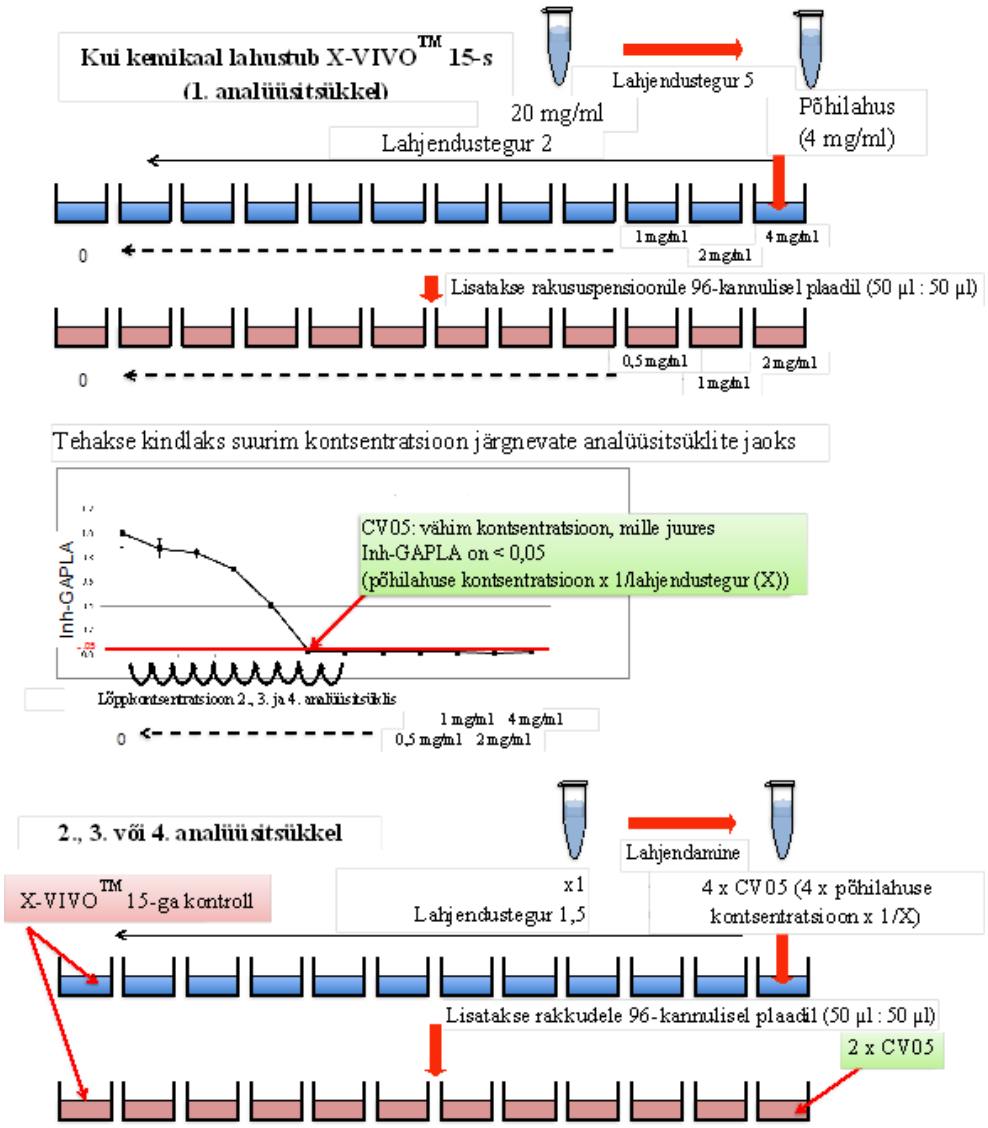
Kuna GAPLA asub nIL8LA arvutamise valemi nimetajas, põhjustab see väga väikestel väärtustel suurt varieeruvust nIL8LA väärtustes. Seepärast võib Ind-IL8LA väärtusi, mis on saadud Inh-GAPLA väga väikeste väärtuste puhul (alla 0,05), pidada ebatäpseks.

▼**M8**

Liide 3.5

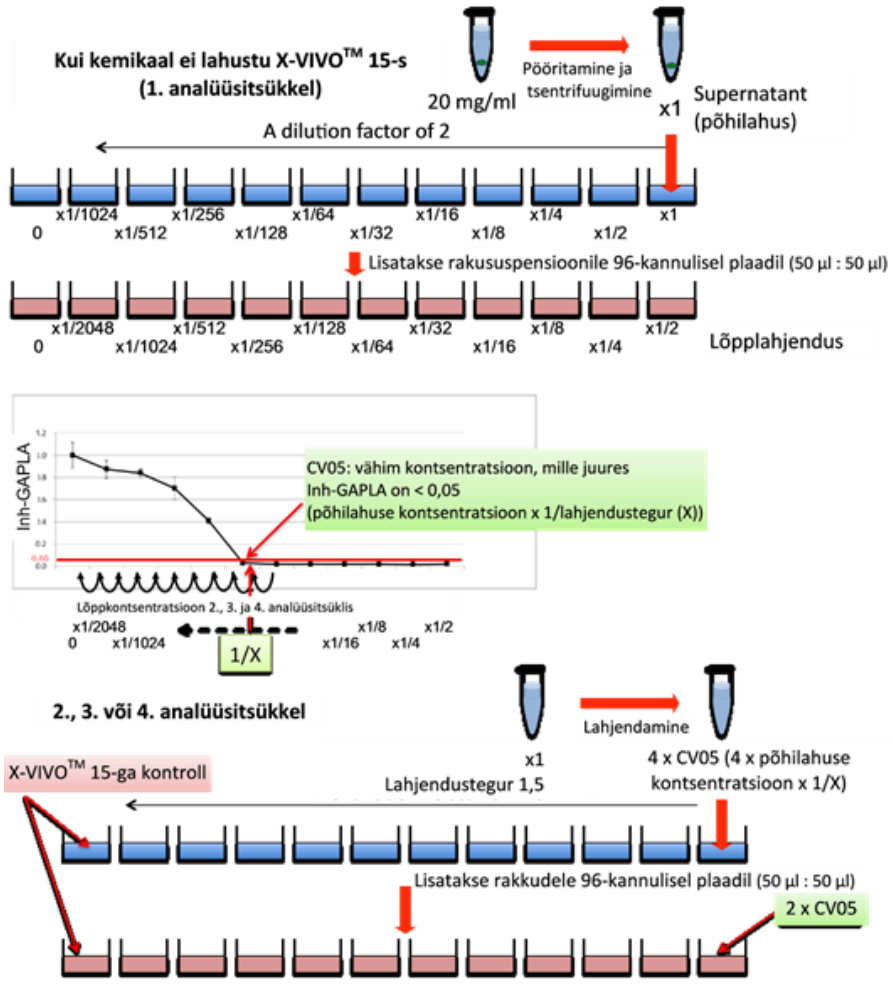
IL-8 LUTSIFERAASIKATSES KASUTATAV KEMIKAALIDE LAHUSTAMISE SKEEM

a) X-VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml lahustuvad kemikaalid



▼**M8**

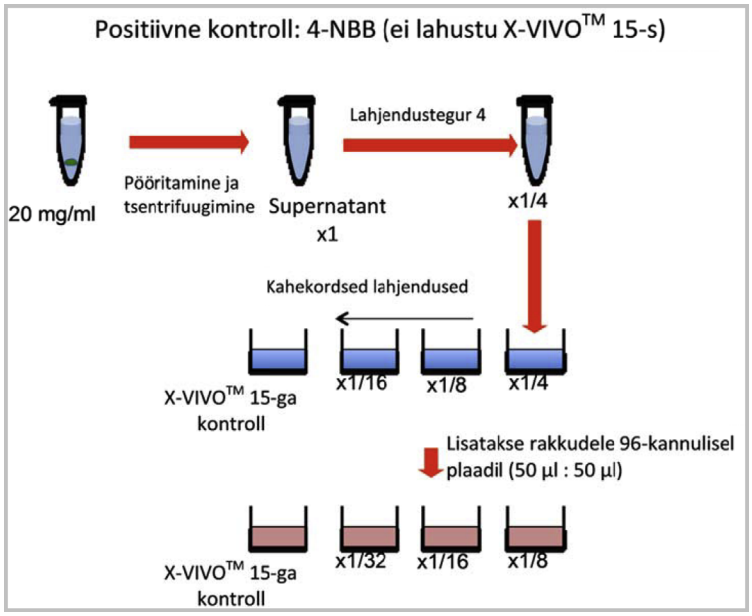
b) X-VIVO™ 15-s kontsentratsioonil 20 mg/ml lahustumatud kemikaalid



▼**M8**

Liide 3.6

IL-8 LUTSIFERAASIKATSES POSITIIVSE KONTROLLINA KASUTATAVA 4-NBB LAHUSTAMISE SKEEM



▼B

C OSA: KESKKONNAMÜRGISUSE MÄÄRAMISE MEETODID

SISUKORD

C.1. ÄGE MÜRGISUS KALADELE

C.2. *DAPHNIA* SP. LIIKUMISVÕIME AKUUTSE PÄRSSIMISE KATSE

C.3. MAGEVEEVETIKATE JA TSÜANOBAKTERITE KASVU PIDURDUMISE KATSE

C.4. KOHESE BIOLAGUNDUVUSE MÄÄRAMINE

I OSA. ÜLDPÕHIMÕTTED

II OSA. DOC KÕRVALDAMISE KATSE (meetod C.4-A)

III OSA. MUUDETUD OECD SÕELKATSE (meetod C.4-B)

IV OSA. CO_2 ERALDUMISE KATSE (meetod C.4-C)

V OSA. MANOMEETRILISE RESPIROMEETRIA KATSE (meetod C.4-D)

VI OSA. KINNISE PUDELI KATSE (meetod C.4-E)

VII OSA. MITI KATSE (meetod C.4-F)

C.5. LAGUNEMINE – BIOKEEMILINE HAPNIKUTARVE

C.6. LAGUNEMINE – KEEMILINE HAPNIKUTARVE

C.7. LAGUNEMINE – ABIOOTILINE LAGUNEMINE: HÜDROLÜÜSI SÕLTUVUS pHst

C.8. TOKSILISUS VIHMAUSSIDELE – TEHISMULLA TEST

C.9. BIODEGRADATSIOON – ZAHNI-WELLENSI TEST

C.10. REOVEE AEROOBSE TÖÖTLEMISE SIMULATSIOONIKATSE: C.10-A: AKTIIVMUDA – C.10-B: BIOKILED

C.11. AKTIIVMUDA MIKROORGANISMIDE HINGAMISE (SÜSINIKU JA AMMOONIUMI OKSÜDEERIMISE) PÄRSSIMISE KATSE

C.12. BIODEGRADATSIOON – MODIFITSEERITUD SCAS TEST

C.13. BIOAKUMULEERUMINE KALADES: KOKKUPUUDE VEE JA TOIDU KAUDU

C.14. NOORKALADE KASVUKATSE

C.15. KALA EMBRÜO JA REBUKOTIGA VASTSETEGA TEHTAV LÜHIAJALINE TOKSILISUSE KATSE

C.16. MESILASED – AKUUTSE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE

C.17 MESILASED – AKUUTSE KONTAKTTOKSILISUSE KATSE

C.18. ADSORPTSIOON/DESORPTSIOON, KASUTADES PARTII TASAKAALUSTAMISE MEETODIT

▼B

C.19.	ADSORPTSIOONITEGURI (K_{OC}) KINDLAKSMÄÄRAMINE-MULLAS JA REOVEESETTES KÕRGSURVEVEDELIKKRO-MATOGRAAFIA (HPLC) ABIL
C.20.	HIIDKIIVRIKU (*DAPHNIA MAGNA*) SIGIVUSE KATSE
C.21.	MULLAMIKROOBID: LÄMMASTIKU TRAMSFORMAT-SIOONI KATSE
C.22.	MULLAMIKROOBID: SÜSINIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE
C.23.	AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON MULLAS
C.24.	AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON PÕHJASETTES
C.25.	AEROOBNE MINERALISEERUMINE PINNAVEES – BIOLA-GUNEMISE MUDELKATSE
C.26.	PEREKONNA *LEMNA* TAIMEDE KASVU PIDURDUMISE KATSE
C.27.	SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD SETTE KASUTAMISEGA
C.28.	SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD VEE KASUTAMISEGA
C.29.	KIIRE BIOLAGUNDATAVUS – CO_2 SULETUD NÕUDES (VABARUUMI KATSE)
C.30.	BIOAKUMULATSIOON MULLA VÄHEHARJASUSSIDES
C.31.	KATSE MAISMAATAIMEDEGA: TÄRKAMINE JA SEEMIKU KASV
C.32.	VALGELIIMUKLASTE SIGIVUSE KATSE
C.33.	VIHMAUSSIDE (*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*) SIGI-VUSE KATSE
C.34.	ANAEROOBSETE BAKTERITE ELUTEGEVUSE PÄRSSU-MISE MÄÄRAMINE – (REOVEE)SETTE KÄÄRIMISEGA KAASNEVA GAASIERITUSE VÄHENEMINE
C.35.	*LUMBRICULUS*'ELE AVALDUVA MÜRGISUSE HINDAMISE KATSE RIKASTATUD SETTEGA SÜSTEEMIS SETE/VESI
C.36.	RÖÖVLESTA (*HYPOASPIS* (*GEOLAELAPS*) *ACULEIFER*) SIGIVUSE KATSE MULLAS
C.37.	21-PÄEVANE KATSE KALADEGA: LÜHIAJALINE SÕEL-KATSE ÖSTROGEENSE JA ANDROGEENSE TOIME NING AROMATAASI INHIBEERIMISE KONTROLLIMISEKS
C.38.	KAHEPAIKSETE METAMORFOOSI KATSE
C.39.	HOOGHÄNNALISTE MULLAS PALJUNEMISE KATSE

▼B

C.40.	SURUSÄÄSKLASTE (*CHIRONOMIDAE*) ELUTSÜKLI MÜRGISUSKATSE SÜSTEEMIS, MIS KOOSNEB RIKASTATUD SETTEST JA VEEST VÕI SETTEST JA RIKASTATUD VEEST
C.41.	KALADE SUGULISE ARENGU KATSE
C.42.	BIOLAGUNDATAVUS MEREVEES
C.43.	ORGAANILISTE AINETE ANAEROOBNE BIOLAGUNEVUS LÄBIKÄÄRINUD MUDAS: MÕÕTMINE GAASI ERALDUMISE JÄRGI
C.44.	LEOSTUMINE MULLAKOLONNIS
C.45.	PUIDUKONSERVANDIGA TÖÖDELDUD PUIDUST KESKKONDA ERALDUVATE HEITKOGUSTE MÄÄRAMINE. LABORATOORNE MEETOD HEITE MÄÄRAMISEKS KATMATA PUIDUST, MIS ON KOKKUPUUTES MAGEVEE VÕI MEREVEEGA
C.46.	BIOAKUMULATSIOON PÕHJASETETES ELAVATES VÄHEHARJASUSSIDES
C.47.	VARASES ARENGUJÄRGUS KALADELE AVALDUVA MÜRGISUSE KATSE
C.48.	LÜHIAJALINE KALADE PALJUNEMISE KATSE
C.49.	ÄGEDA MÜRGISUSE KATSE KALAEMBRÜOTEGA
C.50.	SETTEVABA MÜRGISUSKATSE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*'IGA
C.51.	MÜRGISUSE HINDAMISE KATSE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*'IGA SÜSTEEMIS VESI/SETE
C.52.	ÜHTE PÕLVKONDA HÕLMAV PIKENDATUD SIGIVUSKATSE JAAPANI RIISIKALAGA (MEOGRT)
C.53.	KULLESTE KASVU JA ARENGU KATSE (LAGDA)

▼B

C.1. ÄGE MÜRGISUS KALADELE

1. MEETOD

1.1. SISSEJUHATUS

Katses määratakse aine äge surmav mürgisus mageveekaladele. Katse kestel testaine piisavalt püsiva kontsentratsiooni tagamiseks parima katsemeetodi (seisva, poolseisva veega või läbivooluga katsesüsteem) valimisel on kasulik teada võimaluse korral aine lahustuvust vees, aururõhku, keemilist stabiilsust, dissotsiatsioonikonstante ja biolagunduvust.

Katse kavandamisel ja tulemuste tõlgendamisel tuleks arvestada ka muid andmeid (näiteks struktuurivalemit, puhtusastet, peamiste lisandite iseloomu ja protsentuaalset sisaldust, lisaainete olemasolu ja koguseid ning oktanooli/vee jaotustegurit).

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Äge mürgisus on märgatav kahjulik mõju, mis avaldub organismis lühikese aja (päevade) jooksul pärast ainega kokkupuudet. Käesolevas katses väljendatakse ägedat mürgisust keskmise surmava kontsentratsioonina (LC_{50}), see tähendab kontsentratsioonina vees, mis surmab kindla katkematu kokkupuuteaja (mis peab olema märgitud) jooksul 50 % katses kasutatud kaladest.

Kõiki testaine kontsentratsioone väljendatakse massiühikutes mahuühiku kohta (milligrammides liitri kohta). Neid võib väljendada ka massiühikutes massiühiku kohta (mg/kg^{-1}).

1.3. VÕRDLUSAINED

Katses võib kasutada võrdlusainet näitamaks, et katseliigi reaktsioon ei ole laboratoorsetes katsetingimustes oluliselt muutunud.

Käesoleva katse jaoks ei ole võrdlusaineid nimetatud.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kontsentratsioonil 100 mg/l võib teha piirsisalduskatse näitamaks, et LC_{50} on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Kalad viiakse 96 tunniks kokkupuutesse veele kindlaksmääratud kontsentratsioonides lisatud testainega. Suremus registreeritakse vähemalt iga 24 tunni tagant ja igas vaatluspunktis arvutatakse võimaluse korral kontsentratsioon, mis surmab 50 % kaladest (LC_{50}).

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Kvaliteedinõuded kehtivad nii piirsisalduskatse kui ka täiskatseprogrammi suhtes.

Kontrollkatsete suremus ei tohi katse lõpuks ületada 10 % (alla kümne kala kasutamisel võib surra vaid üks kala).

Lahustunud hapniku kontsentratsioon peab kogu katse kestel olema kõrgem kui 60 % küllastusväärtusest.

▼B

Testaine kontsentratsioon peab kogu katse kestel olema vähemalt 80 % algkontsentratsioonist.

Katsekeskkonnas hästi lahustuvaid ja püsivaid lahuseid, st arvestataval määral mitte lenduvaid, lagunevaid, hüdrolüüsuvaid ega adsorbeeruvaid lahuseid andvate ainete puhul võib algkontsentratsiooni lugeda võrdseks nimikontsentratsiooniga. Kontsentratsiooni püsimist kogu katse kestel ja kvaliteedinõuete täitmist tuleb tõendada.

Ainete puhul, mis:

i) on katsekeskkonnas vähelahustuvad või

ii) moodustavad stabiilseid emulsioone või dispersioone või

iii) ei ole vesilahuses stabiilsed,

loetakse algkontsentratsiooniks lahuses mõõdetud kontsentratsioon (või veesambas mõõdetud kontsentratsioon, kui lahuses mõõtmine ei ole tehniliselt võimalik). Kontsentratsioon mõõdetakse pärast mõningast tasakaalustumist, kuid enne kalade lahusesse viimist.

Kõigil neil juhtudel tuleb katse kestel teha täiendavaid mõõtmisi, mis kinnitaksid tegelikku kokkupuutekontsentratsiooni ja kvaliteedinõuete täitmist.

pH ei tohiks kõikuda rohkem kui ühe ühiku võrra.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

Kasutada võib kolme tüüpi katseskeemi.

Seisva veega katsesüsteem:

mürgisuse katse ilma katselahuse läbivooluta (lahus ei vahetu katse kestel).

Poolseisva veega katse:

katse ilma katselahuse läbivooluta, kuid regulaarse katselahuse osakaupa vahetamisega pikemate perioodide (nt 24 tunni) järel.

Läbivooluga katse:

mürgisuse katse, mille puhul vesi katsekambrites pidevalt vahetub, kusjuures koos vahetusveega viiakse katsekambritesse ka uuritav kemikaal.

1.6.1. **Reaktiivid**

1.6.1.1. *Testainete lahused*

Vajaliku kontsentratsiooniga põhilahused valmistatakse aine lahustamisel deioniseeritud vees või punktile 1.6.1.2 vastavas vees.

Vajaliku kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamisel. Kõrgete kontsentratsioonide uurimisel võib aine lahustada otse lahjendusvees.

▼B

Aineid kontrollitakse üldjuhul lahustuvuse piirini. Mõnede ainete puhul (nt vees vähelahustuvate, kõrge P_{OW}-ga või vees pigem stabiilse dispersiooni kui tõelise lahuse moodustavate ainete puhul) võib katse teha aine lahustuvuspiirist kõrgemal kontsentratsioonil, et tagada kõrgeima lahustuva/stabiilse kontsentratsiooni saavutamine. Samas on oluline, et see kontsentratsioon ei häiriks katsesüsteemi muul moel (nt nii, et aine kile vee pinnal takistab hapniku lahustumist vees jne).

Vees vähelahustuvate ainete põhilahuste valmistamisel või nende dispergeerimisel katsekeskkonnas võib abivahendina kasutada ultrahelidispergeerimist, orgaanilisi lahusteid, emulgaatoreid või dispergaatoreid. Selliste abiainete kasutamisel peavad kõik katsekontsentratsioonid sisaldama sama koguse abiainet ja täiendavad kontrollkalad tuleks viia kokkupuutesse katseseeriaga võrdväärse abiaine kontsentratsiooniga. Seesuguste abiainete kontsentratsioon katsekeskkonnas peaks olema minimaalne ega tohiks mingil juhul ületada 100 mg/l.

Katse tuleks teha ilma pH-d reguleerimata. Märgatavate pH muutuste ilmnemisel on soovitatav katset reguleeritava pH-ga korrata ja esitada korduskatse tulemused. Eriliste vastunäidustuste puudumisel tuleks sellisel juhul põhilahuse pH reguleerida võrdseks lahjendusvee omaga. Eelistatav on selleks kasutada HCl ja NaOH. pH-d tuleb reguleerida nii, et testaine kontsentratsioon põhilahuses märgatavalt ei muutu. Ära tuleks märkida pH reguleerimisest tingitud võimalikud keemilised reaktsioonid või sademe teke.

1.6.1.2. *Pidamis- ja lahjendusvesi*

Kasutada võib kraanivett (milles ei leidu ohtlikus kontsentratsioonis kloori, raskmetalle ega muid aineid), kvaliteetset looduslikku vett või taastatud vett. Eelistada tuleks vett üldkaredusega 10–250 mg/l (arvestatud $CaCO_3$-na) ja pH-ga 6,0–8,5.

1.6.2. **Seade**

Kõik seadme osad peavad olema valmistatud keemiliselt inertsest materjalist:

— automaatne lahjendussüsteem (läbivooluga katses);

— hapnikumõõtur;

— vee kareduse määramise seade;

— asjakohane termoregulaator;

— pH-meeter.

1.6.3. **Katses kasutatavad kalad**

Kalad peaksid olema terved ja nähtavate väärarenguteta.

▼B

Kasutatav liik tuleks valida praktiliste kaalutluste põhjal, näiteks aastaringse kättesaadavuse, vähese hooldusvajaduse ja hõlpsa katses kasutatavuse põhjal, tundlikkuse põhjal kemikaalide suhtes ja mis tahes asjaomaste majanduslike, bioloogiliste või ökoloogiliste tegurite põhjal. Kalaliigi valikul tuleks silmas pidada andmete võrreldavust ja olemasolevaid rahvusvahelisi kooskõlastusi (viide 1).

Soovitatavate katses kasutatavate liikide nimekiri on esitatud 2. liites; eelistatavad liigid on sebrakala ja vikerforell.

1.6.3.1. *Pidamine*

Katses kasutatavad kalad peaksid olema pärit ühest allikast ja olema sarnase pikkuse ja vanusega. Kalu tuleb vähemalt 12 päeva pidada järgmistel tingimustel:

katseaine sisaldus:

vastavalt süsteemile (tsirkulatsiooni või läbivooluga) ja kalaliigile,

vesi:

vt 1.6.1.2,

valgus:

12–16 tundi päevas,

lahustunud hapniku kontsentratsioon:

vähemalt 80 % küllastusväärtusest,

söötmine:

kolm korda nädalas või iga päev, söötmine lõpetatakse 24 tundi enne katset.

1.6.3.2. *Suremus*

Pärast 48tunnist stabiliseerumisperioodi registreeritakse suremus ja rakendatakse järgmiseid kriteeriume:

— üle 10 % populatsioonist seitsme päeva jooksul:

kalad loetakse sobimatuks;

— 5–10 % populatsioonist:

kalu jälgitakse veel seitse päeva.

Kui suremust rohkem ei esine, on kalad sobivad, vastasel juhul loetakse need sobimatuks;

— alla 5 % populatsioonist:

kalad loetakse sobivaks.

1.6.4. **Kohandumisperiood**

Kõiki kalu tuleb enne katset pidada vähemalt seitse päeva katsetingimustele vastavas vees katsetingimustele vastaval temperatuuril.

▼B

1.6.5. **Katse käik**

Lõplikule katsele võib eelneda annusevahemiku leidmise katse, kus kogutakse andmeid katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kohta.

Lisaks katseseeriale tehakse üks kontrollkatse ilma testaineta ja vajaduse korral ka üks kontrollkatse abiainet sisaldava lahusega.

Vastavalt katseühendi füüsikalis-keemilistele omadustele valitakse kvaliteedinõuete täitmiseks seisva veega, poolseisva veega või läbivooluga katsesüsteem.

Kalad viiakse testainega kokkupuutesse allpool kirjeldatud moel:

— kestus: 96 tundi;

— isendite arv: iga kontsentratsiooni kohta vähemalt seitse;

— mahutid: küllaldase mahuga soovitatava koguse jaoks;

— katseaine sisaldus: seisva veega ja poolseisva veega katsesüsteemis on suurim soovitatav sisaldus 1 g/l, läbivooluga süsteemides võib see olla suurem;

— katsekontsentratsioon: kasutatakse vähemalt viit kontsentratsiooni, mis erinevad üksteisest konstantse teguri (kuni 2,2) võrra ja mis võimaluse korral hõlmavad kogu suremusvahemikku 0–100 %;

— vesi: vt 1.6.1.2;

— valgus: 12–16 tundi päevas;

— temperatuur: vastavalt liigile (2. liide), kuid ei tohi ühegi katse kestel kõikuda rohkem kui ± 1 ^{o}C;

— lahustunud hapniku kontsentratsioon: vähemalt 60 % küllastusväärtusest antud temperatuuril;

— söötmine: ei söödeta.

Kalu vaadeldakse esimese 2–4 tunni pärast ja seejärel vähemalt iga 24 tunni järel. Kalad loetakse surnuks, kui sabavarre puudutamine ei kutsu esile reaktsiooni ja puuduvad nähtavad hingamisliigutused. Surnud kalade avastamisel need kõrvaldatakse ja suremus registreeritakse. Registreeritakse ka nähtavad kõrvalekalded (nt tasakaalu puudumine, muutused ujumiskäitumises, hingamisfunktsioonis või pigmentatsioonis jne).

Iga päev tuleb mõõta pH-d, lahustunud hapniku kontsentratsiooni ja temperatuuri.

Piirsisalduskatse

Käesoleva katsemeetodi protseduuri järgides võib kontsentratsioonil 100 mg/l teha piirsisalduskatse näitamaks, et LC_{50} on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Kui aine iseloom välistab kontsentratsiooni 100 mg/l saavutamise katses kasutatavas vees, tuleks piirsisalduskatse teha kontsentratsioonil, mis on võrdne aine lahustuvusega kasutatavas keskkonnas (või kõrgeimal kontsentratsioonil, kus moodustub stabiilne dispersioon) (vt ka punkti 1.6.1.1).

▼B

Piirsisalduskatses tuleks kasutada 7–10 kala ja samapalju kontrollkalu. (Binomiaalteooria kohaselt võib 99,9 % tõenäosusega väita, et kui 10 kalaga katses on suremus null, siis on LC_{50} piirsisalduskatses kasutatud kontsentratsioonist kõrgem. 7, 8 või 9 kala puhul näitab suremuse puudumine vähemalt 99 % tõenäosusega seda, et LC_{50} on kasutatud kontsentratsioonist kõrgem.)

Suremuse esinemisel tuleb teha täiemahuline uuring. Subletaalse toime avaldumisel tuleks see registreerida.

2. **ANDMED JA HINDAMINE**

Iga vaatlustulemuste registreerimise ajavahemiku puhul (24, 48, 72 ja 96 tundi) tuleb näidata iga soovitatava kokkupuuteperioodi kohta logaritmilisel diagrammil graafiliselt suremusprotsendi sõltuvus kontsentratsioonist.

Võimaluse korral tuleks iga vaatlushetke kohta leida standardmeetodeid kasutades hinnanguline LC_{50} väärtus ja usalduspiirid ($p = 0,05$); need väärtused tuleks ümardada ühe või maksimaalselt kahe tüvenumbrini (kahe tüvenumbrini ümardamise näited: 173,5 → 170; 0,127 → 0,13; 1,21 → 1,2).

Juhtudel, kus kontsentratsiooni/protsentuaalse reaktsiooni kõvera tõus on LC_{50} arvutamiseks liiga suur, piisab selle väärtuse graafilisest hindamisest.

Kui kahe järjestikuse, 2,2kordse vahega kontsentratsiooni suremus on vastavalt 0 ja 100 %, piisab LC_{50} vahemiku näitamiseks neist kahest väärtusest.

Kui täheldatakse, et testaine stabiilsust või homogeensust ei ole võimalik säilitada, tuleks see ära märkida ja olla tulemuste tõlgendamisel ettevaatlik.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— andmeid katses kasutatavate kalade kohta (teaduslikku nimetust, liini, päritolu, mis tahes eelnevat mõjutamist ning igal katsekontsentratsioonil kasutatud kalade suurust ja arvu);

— lahjendusvee päritolu ja peamisi keemilisi näitajaid (pH, karedus, temperatuur);

— vees vähelahustuva aine puhul põhi- ja katselahuste valmistamise meetodit;

— kõigi abiainete kontsentratsiooni;

— kasutatud kontsentratsioone ja kõiki olemasolevaid andmeid uuritava kemikaali kontsentratsioonide stabiilsuse kohta katselahuses;

— keemiliste analüüside tegemisel kasutatud meetodeid ja saadud tulemusi;

— piirsisalduskatse tulemusi, kui see tehti;

— kasutatud katsemeetodi valiku põhjusi ja meetodi üksikasju (nt seisva veega, poolseisva veega katsesüsteem, annustamiskiirus, läbivoolu kiirus, aeratsioon, kalade hulk jne);

▼B

— katseseadmete kirjeldust;

— valgusrežiimi;

— katselahuste hapnikusisaldust, pH väärtusi ja temperatuuri iga 24 tunni järel;

— tõendeid kvaliteedinõuete täitmise kohta;

— tabelit kumulatiivse suremuse kohta igal kontsentratsioonil ja kontrollkatses (ja vajaduse korral abiainega kontrollkatses) kõigil soovitatud vaatlushetkedel;

— kontsentratsiooni/protsentuaalse reaktsioonikõvera graafikut katse lõpus;

— võimaluse korral LC_{50} väärtusi kõigil soovitatud vaatlushetkedel (95 % usalduspiiridega);

— LC_{50} määramisel kasutatud statistilisi meetodeid;

— võrdlusainete kasutamisel nendega saadud tulemusi;

— kõrgeimat katsekontsentratsiooni, mille puhul katse kestel suremust ei esinenud;

— madalaimat katsekontsentratsiooni, mille puhul suremus katse kestel oli 100 %.

4. **VIITED**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

2) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* - Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.

3) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* - Static and Flow Through methods – NFT 90-305 June 1985.

4) ISO 7346/l,/2 and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8) NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.986.

15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50.C50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I..I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

1. liide

Taastatud vesi

Sobiva lahjendusvee näited

Kõik kemikaalid peavad olema analüüsipuhtad.

Vesi peaks olema kvaliteetne destilleeritud vesi või deioniseeritud vesi juhtivusega alla 5 $\mu S/cm^{-1.}$

Vee destilleerimise seade ei tohi sisaldada vaskosi.

Põhilahused

$CaCl_2$. $2H_2O$ (kaltsiumkloriiddihüdraat): 11,76 g

Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.

$MgSO_4$. $7H_2O$ (magneesiumsulfaatheptahüdraat): 4,93 g

Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.

$NaHCO_3$ (naatriumvesinikkarbonaat): 2,59 g

Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.

KCl (kaaliumkloriid): 0,23 g

Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.

Taastatud lahjendusvesi

25 ml kõigist neljast põhilahusest segatakse kokku ja täiendatakse veega 1 liitrini.

Aereeritakse, kuni hapnikusisaldus jõuab küllastuskontsentratsioonini.

pH peaks olema 7,8 ± 0,2.

Vajaduse korral reguleeritakse pH-d NaOH (naatriumhüdroksiidi) või HCl-ga (vesinikkloriidhappega).

Sel viisil valmistatud lahjendusvett lastakse 12 tundi seista ja seda ei tohi enam aereerida.

Ca ja Mg ioonide summaarne kogus selles lahuses on 2,5 mmol/l. Ca:Mg ioonide suhe on 4:1 ja Na:K ioonide suhe 10:1. Lahuse üldleelisus on 0,8 mmol/1.

Ükski kõrvalekalle lahjendusvee valmistamisprotseduurist ei tohi muuta vee koostist või omadusi.

▼B

2. liide

Katseks soovitatavad kalaliigid

Soovitatav liik	Soovitatav katse-temperatuuride vahemik (°C)	Soovitatav katseisendi täis-pikkus (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebrakala	20–24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Pakspea lepamaim	20–24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Sasaan	20–24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck ja Schlegel 1850) Riisikala	20–24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Gupi	20–24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Suur päikeseahven	20–24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Vikerforell	12–17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Harilik säinas	20–24	6,0 ± 2,0

Kogumine

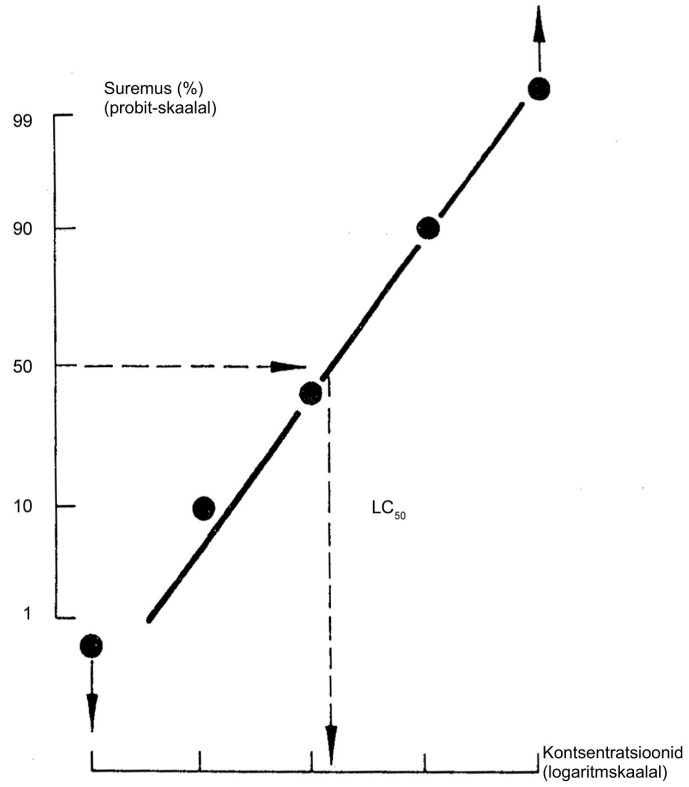
Eespool loetletud kalu on lihtne kasvatada ja/või neid on võimalik aasta läbi hankida. Neid on võimalik aretada ja kasvatada kalakasvandustes või laboris, tingimustes, kus haigused ja parasiidid on kontrolli all, nii et katses kasutatav isend on terve ja tema põlvnemine teada. Need kalad on saadaval mitmel pool maailmas.

▼B

3. liide

Kontsentratsiooni näide: suremusprotsendi sõltuvus

Näide LC_{50} määramise kohta logaritmilise probit-diagrammi abil



▼B

C.2. *DAPHNIA* SP. LIIKUMISVÕIME AKUUTSE PÄRSSIMISE KATSE

1. MEETOD

Käesolev liikumisvõime akuutse pärssimise katsemeetod vastab suunisele OECD TG 202 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolevas metoodikas kirjeldatakse akuutse toksilisuse katset kemikaalide toime hindamiseks vesikirpudele. Olemasolevaid katsemeetodeid kasutati võimalikus ulatuses (viited 1, 2, 3).

1.2. MÕISTED

Käesoleva metoodika puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

EC_{50} – kontsentratsioon, mis hinnanguliselt muudab liikumisvõimetuks 50 % vesikirpudest konkreetse kokkupuuteaja vältel. Muu määratluse kasutamisest tuleb teatada ja anda viide.

Liikumisvõime kaotus – neid loomi, kes ei ole võimelised ujuma 15 sekundi jooksul pärast katseanuma ettevaatlikku raputamist, loetakse liikumisvõime kaotanuks (isegi kui nad suudavad liigutada oma tundlaid).

1.3. MEETODI PÕHIMÕTE

Noored vesikirbud vanuses kuni 24 tundi (katse alguseks) viiakse kokkupuutesse uuritava aine eri kontsentratsioonidega 48 tunniks. Liikumisvõime kaotus registreeritakse 24 ja 48 tunni pärast ja seda võrreldakse kontrollkatse väärtustega. Tulemustest arvutatakse EC_{50} 48 tunni pärast (vt punkt 1.2, määratlus). EC_{50} kindlaksmääramine pärast 24tunnist kokkupuudet ei ole kohustuslik.

1.4. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Teada peaksid olema uuritava aine lahustuvus vees ja aururõhk ning peaks olema usaldusväärne analüütiline meetod, mille abil määrata kindlaks aine kogus uuritavas lahuses ja mille kohta on teada määramise saagis ja määramispiir. Kasulik on teada järgmist: struktuurvalem, aine puhtus, püsivus vees või valguse käes, P_{OW} ja kiire biolagundatavuse katse tulemused (vt meetod C.4).

Märkus: suunised uuritava aine kohta, mille mõju uurimist raskendavad selle füüsikalis-keemilised omadused, on esitatud viites 4.

1.5. VÕRDLUSAINED

EC_{50} määramist võrdlusaine jaoks võib pidada vahendiks, millega tõendatakse katsetingimuste usaldusväärsust. Selleks soovitatakse kasutada rahvusvahelistes laboritevahelistes võrdluskatsetes kasutatavaid mürkaineid (viited 1, 5) [1]. Katse(d) võrdlusainega tuleb teha eelistatavalt iga kuu, kuid kindlasti vähemalt kaks korda aastas.

[1] Kõnealuste laboritevaheliste katsete tulemuste ja standardi ISO 6341 tehnilise paranduse kohaselt asub kaaliumdikromaadi ($K_2Cr_2O_7$) 24 tunni EC_{50} vahemikus 0,6 mg/l kuni 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Määramise õigsuse tõendamisel kohaldatakse järgmisi kriteeriume:

— kontrollkatsetes, sealhulgas lahuse valmistamisel kasutatud abiainega kontrollkatsetes, ei tohiks liikumisvõimet kaotada üle 10 % vesikirpudest;

— lahustunud hapniku kontsentratsioon katse lõpus peab kontrollkatse- ja katseanumates olema ≥ 3 mg/l.

Märkus: esimese kriteeriumi puhul ei tohi rohkem kui 10 %-l vesikirpudest esineda liikumisvõime kaotust või muid haiguse või stressi nähte, näiteks värvuse muutust, ebaharilikku käitumist nagu veepinnale lõksu jäämine.

1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.7.1. **Seadmed**

Katseanumad ja muud seadmed, mis puutuvad kokku katselahustega, peavad täielikult olema valmistatud klaasist või keemiliselt inertsest materjalist. Katseanumateks on tavaliselt klaasist katseklaasid või keeduklaasid, neid tuleb tavaliste laborimeetoditega puhastada enne iga kasutamist. Katseanumad peavad olema vabalt kaetud, et vähendada veekaotust auramise tõttu ja vältida tolmu sattumist lahustesse. Lenduvaid aineid tuleb uurida tihedalt suletud nõudes, mis on piisavalt suured, et hapnikusisaldus ei hakkaks limiteerima ega langeks liiga madalale (vt osa 1.6 ja osa 1.8.3 esimene lõik).

Lisaks kasutatakse veel järgmisi vahendeid: hapnikumõõtja (mikroelektroodi või muu sobiva anduriga, mis võimaldaks mõõta lahustunud hapnikku väikese ruumalaga proovis), pH-meeter, temperatuuri reguleerimiseks vajalik seade, seade orgaanilise süsiniku kogusisalduse (TOC) määramiseks, seade keemilise hapnikutarbe (COD) määramiseks, seade vee kareduse määramiseks jne.

1.7.2. **Katsealune organism**

Daphnia magna Straus on eelistatud katseliik, kuigi kõnealuses katses võib kasutada ka muid sobivaid *Daphnia* liike (nt *Daphnia pulex)*. Katse alguses peavad loomad olema alla 24 tunni vanad ja varieeruvuse vähendamiseks soovitatakse tungivalt, et nad ei oleks esimese haudme järglased. Nad peavad olema terved (st neil ei tohi esineda selliseid stressi tunnuseid nagu suur suremus, isaste ja puhkeolekus munade esinemine, esimese haudme saamise viibimine, loomade värvuse muutus jne). Kõik konkreetses katses kasutatavad organismid peavad pärinema vesikirpude sama populatsiooni kultuuridest. Populatsiooni loomi tuleb säilitada katsetingimustega sarnanevates kasvutingimustes (valgus, temperatuur, keskkond). Kui katses kasutatav vesikirpude kasvukeskkond erineb sellest, mida kasutatakse tavalise vesikirpude kultuuri jaoks, on heaks tavaks näha ette katse-eelne aklimatiseerumisperiood. Selleks tuleb haudmevesikirpe hoida lahjendamiseks kasutatavas vees katsetemperatuuril vähemalt 48 tundi enne katse alustamist.

▼B

1.7.3. **Hoidmisvesi ja lahjendamiseks kasutatav vesi**

Hoidmisveena ja lahjendamiseks kasutatava veena lubatakse kasutada looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett või deklooritud kraanivett, kui vesikirbud jäävad selles ellu kasvatamise, aklimatiseerimise ja katsetamise ajal ega ilmuta stressi tunnuseid. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 1. liites esitatud nõuetekohase lahjendamiseks kasutatava vee keemilistele omadustele. See vesi peab katse vältel olema ühesuguse kvaliteediga. Taastatud vee valmistamiseks lisatakse deioniseeritud või destilleeritud veele täpsed kogused tunnustatud analüütilise puhtusega reaktiive. Viidetes 1 ja 6 ning 2. liites on esitatud taastatud vee näited. Metalle sisaldavate uuritavate ainete puhul tuleks vältida kelaadimoodustajaid sisaldavaid toitesegusid, nagu M4 ja M7 2. liites. pH peaks olema vahemikus 6–9. Karedus peaks *Daphnia Magna* puhul olema vahemikus 140–250 mg/l ($CaCO_3$-na); teiste *Daphnia* liikide puhul võib sobida väiksem karedus. Lahjendamiseks kasutatavat vett võib enne katses kasutamist aereerida, et lahustunud hapniku kontsentratsioon jõuaks küllastuseni.

Kui kasutatakse looduslikku vett, tuleb selle kvaliteedi parameetreid mõõta vähemalt kaks korda aastas või kui kahtlustatakse, et need omadused võivad olla oluliselt muutunud (vt eelmist lõiku ja 1. liidet). Samuti tuleb mõõta raskmetallide (st Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) sisaldus. Kui kasutatakse deklooritud kraanivett, on soovitatav iga päev mõõta kloori sisaldust. Kui lahjendamiseks kasutatakse pinna- või põhjavett, tuleb mõõta juhtivus ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus (TOC) või keemiline hapnikutarve (COD).

1.7.4. **Katselahused**

Valitud kontsentratsioonidega katselahused saadakse tavaliselt põhilahuse lahjendamisel. Põhilahuse valmistamiseks on soovitatav lahustada aine lahjendamiseks kasutatavas vees. Võimaluse korral tuleb vältida lahustite, emulgaatorite ja dispersantide kasutamist. Siiski võivad nimetatud ühendid olla teatud juhtudel vajalikud piisava kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks. Suunised sobivate lahustite, emulgaatorite ja dispersantide kohta on esitatud viites 4. Igal juhul ei tohi uuritava aine sisaldus katselahustes olla kõrgem kui lahustuvuse piir lahjendamiseks kasutatavas vees.

Katse tuleb teha ilma pH-d muutmata. Kui pH ei püsi vahemikus 6–9, siis võib teha teise katse, milles põhilahuse pH väärtuseks seatakse lahjendamiseks kasutatava vee pH väärtus enne uuritava aine lisamist. pH tuleb korrigeerida nii, et see ei muudaks oluliselt põhilahuse kontsentratsiooni ega põhjustaks uuritava aine keemilist reaktsiooni ega sadenemist. Eelistatakse HCl ja NaOH lahuseid.

▼B

1.8. KATSE KÄIK

1.8.1. **Kokkupuutetingimused**

1.8.1.1. *Katserühmad ja kontrollkatsed*

Katseanumasse viiakse vajalik kogus lahjendamiseks kasutatavat vett ja uuritava aine lahust. Õhu ja vee mahu suhe anumates peab olema katse- ja kontrollrühma puhul ühesugune. Seejärel lisatakse anumatesse vesikirbud. Iga uuritava kontsentratsiooni juures ja ka kontrollkatses tuleb kasutada vähemalt 20 looma, eelistatavalt jaotatuna neljaks viieloomaliseks rühmaks. Iga looma kohta peab olema vähemalt 2 ml uuritavat lahust (st viie vesikirbu kohta peab katseanumas olema 10 ml lahust). Katse tegemisel võib kasutada poolstaatilist uuendamist või läbivoolusüsteemi, kui uuritava aine kontsentratsioon ei ole püsiv.

Lisaks uuritavate lahuste seeriatele tuleb kasutada ühte lahjendamiseks kasutatava vee kontrollseeriat ja vajaduse korral ühte kontrollseeriat, mis sisaldab lahuse valmistamisel kasutatud abiainet.

1.8.1.2. *Uuritavad kontsentratsioonid*

Kui uuritava aine toksilisuse kohta ei ole andmeid, võib lõpliku katse kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramiseks teha eelkatse. Selleks viiakse vesikirbud kokkupuutesse lahustega, mis sisaldavad uuritavat ainet suuresti erinevas kontsentratsioonis. Viit vesikirpu hoitakse uuritava aine teatava kontsentratsiooniga lahuses kuni 48 tundi; korduskatseid ei ole vaja. Kokkupuuteaeg võib olla lühem (nt 24 tundi või vähem), kui vahemiku kindlaksmääramiseks vajalikud andmed saadakse kiiremini.

Tuleb kasutada vähemalt viit uuritavat kontsentratsiooni. Need peavad olema geomeetrilises jadas, mille kordaja on eelistatavalt mitte üle 2.2. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleb seda põhjendada. Kõige kõrgema uuritava kontsentratsiooni tulemuseks peaks eelistatavalt olema 100 %line liikumisvõime kaotus ja kõige madalamal uuritaval kontsentratsioonil ei peaks eelistatavalt olema jälgitavat toimet.

1.8.1.3. *Inkubatsioonitingimused*

Temperatuur peab olema vahemikus 18–22 °C ja iga üksiku katse puhul peaks see olema konstantne piirides ± 1 °C. Soovitatav on 16tunnise valguse ja kaheksatunnise pimeduse tsükkel. Lubatud on ka täielik pimedus, eriti testitavate ainete puhul, mis on valguse käes ebastabiilsed.

Katseanumaid ei tohi katse ajal aereerida. Katse tehakse ilma pH-d muutmata. Vesikirpe ei tohi katse ajal toita.

1.8.1.4. *Kestus*

Katse kestus on 48 tundi.

1.8.2. **Vaatlused**

Igas katseanumas tuleb 24 ja 48 tundi pärast katse algust määrata liikumisvõime kaotanud vesikirpude arv (vt punkt 1.2 „Mõisted”). Lisaks liikumisvõime kaotusele tuleb registreerida kõik normist kõrvalekaldumised käitumises või välimuses.

▼B

1.8.3. **Analüütilised mõõtmised**

Katse alguses ja lõpus mõõdetakse kontrollkatse(te)s ja kõige kõrgema uuritava aine kontsentratsiooniga lahuses lahustunud hapniku sisaldus ja pH. Lahustunud hapniku sisaldus kontrollkatsetes peab vastama määramise õigsuse kriteeriumile (vt punkt 1.6). pH ei tohiks tavaliselt muutuda üle 1,5 ühiku üheski katses. Temperatuuri mõõdetakse tavaliselt kontrollkatse anumates või ümbritsevas õhus ja see tuleb kirja panna eelistatavalt pidevalt katse käigus või äärmisel juhul vähemalt katse alguses ja lõpus.

Uuritava aine kontsentratsioon tuleb mõõta vähemalt kõige kõrgemal ja madalamal kontsentratsioonil katse alguses ja lõpus (viide 4). Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Ent kui saab tõendada, et uuritava aine kontsentratsioon on katse jooksul rahuldavalt säilinud ± 20 % juures nominaalsest või mõõdetud algkontsentratsioonist, võivad katse tulemused põhineda nominaalsetel või mõõdetud algväärtustel.

1.9. PIIRSISALDUSKATSE

Käesolevat meetodit kasutades võib teha piirsisalduskatse uuritava aine kontsentratsioonil 100 mg/l või katsekeskkonnas lahustuvuse piiril (olenevalt sellest, kumb neist on madalam) ja tõendada nii, et EC_{50} on kõrgem kui see kontsentratsioon. Piirsisalduskatse tegemisel tuleb kasutada 20 vesikirpu (eelistatavalt jaotatuna neljaks viieloomaliseks rühmaks) ja panna sama arv loomi ka kontrollkatse(te)sse. Kui kas või osagi vesikirpudest kaotab liikumisvõime, tuleb sooritada täielik uuring. Iga kõrvalekalle normaalsest käitumisest tuleb registreerida.

2. **ANDMED**

Andmed tuleb esitada kokkuvõtvas tabelis, näidates iga katse- ja kontrollrühma jaoks kasutatud vesikirpude arvu ja liikumisvõime kaotuse igal vaatlemisel. Koostatakse graafik 24 ja 48 tundi pärast liikumisvõime kaotanud vesikirpude protsendi sõltuvuse kohta uuritava aine kontsentratsiooni. Andmeid analüüsitakse sobivate statistiliste meetoditega (nt probit-analüüs jne), et arvutada kõverate tõusud ja EC_{50} 95 %lised usalduspiirid ($p = 0,05$) (7, 8).

Kui saadud andmete puhul ei saa EC_{50} arvutamise standardmeetodeid rakendada, tuleb EC_{50} umbkaudseks määramiseks kasutada kõige kõrgemat kontsentratsiooni, mis ei põhjusta liikumisvõime kaotust, ja kõige madalamat kontsentratsiooni, mis põhjustab liikumisvõime kaotuse 100 % (selleks peetakse nende kahe kontsentratsiooni geomeetrilist keskmist).

3. **TULEMUSTE VORMISTAMINE**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuandes esitatakse järgmine teave.

Uuritav aine:

— füüsikaline laad ja olulised füüsikalis-keemilised omadused;

▼B

— andmed keemiliseks identifitseerimiseks, sealhulgas puhtus.

Katseorganismi liik:

— *Daphnia* päritolu ja liik, algne tarnija (kui on teada) ja kasutatud kultuuri tingimused (kaasa arvatud toidu päritolu, tüüp ja kogus, toitmise sagedus).

Katsetingimused:

— katseanumate kirjeldus: anumate tüüp, lahuse kogus, vesikirpude arv katseanuma kohta, katseanumate (korduskatsete) arv kontsentratsiooni kohta;

— põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, kaasa arvatud mis tahes lahustite või dispersantide kasutamine, kasutatud kontsentratsioonid;

— üksikasjad lahjendamiseks kasutatava vee kohta: vee päritolu ja kvaliteediomadused (pH, karedus, Ca/Mg suhe, Na/K suhe, aluselisus, juhtivus jne); taastatud vee koostis, kui seda kasutati;

— inkubatsioonitingimused: temperatuur, valguse intensiivsus ja valgustamise perioodid, lahustunud hapnik, pH jne.

Tulemused:

— kontrollkatsetes ja igas katserühmas mis tahes vaatlusajal liikumisvõime kaotanud või kõrvalekaldeid (kaasa arvatud ebanormaalne käitumine) ilmutanud vesikirpude arv ja protsent ning ilmnenud nähtuste kirjeldus;

— võimaluse korral võrdlusainega tehtud katse tulemused ja kuupäev;

— nominaalsed uuritavad kontsentratsioonid ja kõik tulemused, mis saadi uuritava aine kontsentratsiooni määramisel katseanumas; samuti tuleb teatada määramismeetodi saagis ja määramispiir;

— kõigi katse ajal tehtud füüsikalis-keemiliste mõõtmiste tulemused: temperatuuri, pH ja lahustunud hapniku väärtused;

— EC_{50} 48 tunni pärast koos usaldusintervallidega ja graafik sobitatud mudeli kohta, millest need arvutati, annuse ja toime kõverate tõusud ja nende standardviga; EC_{50} kindlaksmääramiseks kasutatud statistiline meetod (kui määrati ka liikumisvõime kadu 24 tunni pärast, tuleb esitada ka need andmed);

— selgitused iga kõrvalekalde kohta katse tegemise eeskirjast ja arutelu, kuivõrd see võis mõjutada katse tulemusi.

4. **VIITED**

1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. Pp 65-84

8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

1. liide

LAHJENDAMISEKS KASUTATAVA VEE NÕUTAVAD KEEMILISED OMADUSED

Aine	Kontsentratsioon
tahked osakesed	< 20 mg/l
orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
jääkkloor	< 10 µg/l
fosfororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus	< 50 ng/l
kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide kogusisaldus	< 50 ng/l
orgaanilise kloori kogusisaldus	< 25 ng/l

▼B

2. liide

SOBIVA TAASTATUD KATSEVEE NÄITED

SO katsevesi (1)

Põhilahused (üks aine)		Taastatud vee valmistamiseks lisada järgmised põhilahuste kogused 1 liitrile veele (*)
Aine	1 liitrile veele lisatav kogus (*)	
kaltsiumkloriid $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
magneesiumsulfaat $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
naatriumvesinikkarbonaat $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
kaaliumkloriid KCl	0,23 g	25 ml

(*) Sobiva puhtusastmega vesi, st puhastatud ioonvahetuse, destilleerimise või pöördosmoosiga; vee juhtivus ei ületa eelistatavalt 10 $\mu S/cm^{-1}$.

Elendti keskkonnad M7 ja M4

Aklimatiseerimine Elendti keskkondadega M4 ja M7

Mõnes laboris on olnud raskusi vesikirbu otsesel üleviimisel keskkondadesse M4 ja M7. Teatavat edu on siiski saavutatud järkjärgulise aklimatiseerimisega, st viimisega oma keskkonnast 30 %lisse, siis 60 %lisse ja seejärel 100 %lisse Elendti keskkonda. Aklimatiseerumisperioodid võivad olla kuu aja pikkused.

Valmistamine

Mikroelemendid

Individuaalsete mikroelementide põhilahused (I) valmistatakse esmalt sobiva puhtusega vees, st deioniseeritud, destilleeritud või pöördosmoosiga puhastatud vees. Nendest põhilahustest (I) valmistatakse järgmine üks põhilahus (II), mis sisaldab kõiki mikroelemente (kombineeritud lahus), st:

I põhilahus(ed) (üks aine)	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkond M4-ga võrreldes)	Kombineeritud II põhilahuse valmistamiseks lisada veele järgmine kogus I põhilahust (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000kordne	1,0	0,25
$MnCl_2$-$4H_2O$	7 210	20 000kordne	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000kordne	1,0	0,25

▼B

I põhilahus(ed) (üks aine)	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkond M4-ga võrreldes)	Kombineeritud II põhilahuse valmistamiseks lisada veele järgmine kogus I põhilahust (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000kordne	1,0	0,25
$SrCl_2$-$6H_2O$	3 040	20 000kordne	1,0	0,25
NaBr	320	20 000kordne	1,0	0,25
Na_2MoO_4-$2H_2O$	1 230	20 000kordne	1,0	0,25
$CuCl_2$-$2H_2O$	335	20 000kordne	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000kordne	1,0	1,0
$CoCl_2$-$6H_2O$	200	20 000kordne	1,0	1,0
KI	65	20 000kordne	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000kordne	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000kordne	1,0	1,0
Na_2EDTA-$2H_2O$	5 000	2 000kordne	—	—
$FeSO_4$-$7H_2O$	1 991	2 000kordne	—	—

Na_2EDTA ja $FeSO_4$ lahused valmistatakse eraldi, valatakse kokku autoklaavitakse kohe

Nii saadakse:

2 l Fe-EDTA lahust		1 000kordne	20,0	5,0

Keskkonnad M4 ja M7

Keskkondade M4 ja M7 valmistamiseks kasutatakse II põhilahust, makrotoitaineid ja vitamiine järgmiselt:

	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkond M4-ga võrreldes)	Keskkonnale lisatav II põhilahuse kogus (ml/1)	
			M4	M7
II põhilahus (kombineeritud mikroelemendid)		20kordne	50	50
Makrotoitainete põhilahused (üks aine)				
$CaCl_2$ – $2H_2O$	293 800	1 000kordne	1,0	1,0
$MgSO_4$ – $7H_2O$	246 600	2 000kordne	0,5	0,5
KCI	58 000	10 000kordne	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000kordne	1,0	1,0
Na_2SiO_3 – $9H_2O$	50 000	5 000kordne	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000kordne	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000kordne	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000kordne	0,1	0,1

▼B

	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkond M4-ga võrreldes)	Keskkonnale lisatav II põhilahuse kogus (ml/l)	
			M4	M7
Kombineeritud vitamiinide põhilahus	—	10 000kordne	0,1	0,1
Kombineeritud vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse 3 vitamiini 1 liitrile veele järgmistes kogustes:				
tiamiinvesinikkloriid	750	10 000kordne		
tsüanokobalamiin (B_{12})	10	10 000kordne		
biotiin	7,5	10 000kordne		

Kombineeritud vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena. Vitamiinid lisatakse keskkonnale vahetult enne kasutamist.

NB: Soolade sadenemise vältimiseks lisatakse täieliku keskkonna valmistamisel põhilahuste alikvoodid umbes 500–800 ml deioniseeritud veele ja seejärel täiendatakse veega kuni 1 liitrini.

NB: Keskkonna M4 koostis avaldati esimest korda järgmises artiklis: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M6

C.3. MAGEVEEVETIKATE JA TSÜANOBAKTERITE KASVU PIDURDUMISE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 201 (2006, lisa parandatud 2011. aastal). On ilmnenud vajadus laiendada käesolevat katsemeetodit uutele liikidele ning seda ajakohastada, et viia see kooskõlla kemikaalide ohu hindamist ja nende klassifitseerimist käsitlevate nõuetega. Meetodi läbivaatamisel võeti aluseks ulatuslik praktiline kogemus, teaduse areng vetikatele mürgiste kemikaalide uurimise valdkonnas ja meetodi laialdane regulatiivsel eesmärgil kasutamine pärast algse meetodi vastuvõtmist.

2. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

3. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju magevee-mikrovetikate ja/või tsüanobakterite kasvule. Eksponentsiaalse kasvu faasis olevatel katseorganismidel lastakse mittepidevas kultuuris puutuda kokku uuritava kemikaaliga tavaliselt 72 tunni jooksul. Vaatamata katse suhteliselt lühikesele kestusele võimaldab see hinnata kemikaali mõju mitmes katseorganismide põlvkonnas.

4. Katse eeldatav tulemus on seeria vetikakultuuride (katseüksused) kasvu pidurdumine kokkupuutel eri kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaaliga. Katsetulemuste hindamiseks uuritakse kasvu sõltuvust kemikaali kontsentratsioonist ja võrreldakse seda keskmise kasvuga paralleelsetes kontrollkultuurides, kuhu uuritavat kemikaali ei ole lisatud. Et võimaldada mürgise mõju täielikku avaldumist sellises süsteemis (optimaalne tundlikkus), lastakse kultuuridel küllaldase toitainete sisalduse juures ja pideva valguse käes piisava aja jooksul piiramatult eksponentsiaalselt kasvada, et oleks võimalik mõõta kasvu erikiiruse vähenemist.

5. Kasvu ja selle pidurdumise kvantitatiivseks iseloomustamiseks mõõdetakse vetikate biomassi sõltuvust ajast. Vetikate biomassi kogus on määratletud kuivmassina ruumalaühiku kohta, nt milligrammides katselahuse liitri kohta. Kuna kuivmassi on raske mõõta, kasutatakse asendusparameetreid. Kõige sagedamini kasutatakse asendusparameetrina rakkude arvu. Asendusparameetriteks võivad olla ka rakkude summaarne ruumala, fluorestsents, optiline tihedus jne. On vaja teada kordajat, mille abil saab mõõdetava asendusparameetri ümber arvutada biomassiks.

6. Katse lõppnäitaja on kasvu pidurdumine, kusjuures kasvu väljendatakse biomassi koguse logaritmitud väärtuse suurenemisena kokkupuuteaja jooksul (keskmine kasvu erikiirus). Katselahuste seerias määratud keskmiste kasvu erikiiruste põhjal tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille puhul kasvukiirus väheneb teatud kindla protsendi x (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul E_rC_x (nt E_rC_{50}).

7. Käesoleva meetodi puhul kasutatakse süsteemi vastust iseloomustava muutujana ka saagist, mille määramine võib olla vajalik mõnes riigis kehtivate regulatiivsete erinõuete täitmiseks. Saagis on määratletud kui kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud biomassikoguste vahe. Katselahuste seerias määratud saagiste põhjal arvutatakse kontsentratsioon, mille puhul saagis väheneb teatud kindla protsendi x (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul E_yC_x (nt E_yC_{50}).

8. Peale selle võib statistiliselt kindlaks teha vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC).

▼M6

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

9. Katsetingimuste kindlaksmääramiseks võib uuritava kemikaali kohta olla kasulik teada muu hulgas järgmisi andmeid: struktuurivalem, puhtus, püsivus valguse käes, püsivus katsetingimuste juures, valguse neeldumisega seotud omadused, pK_a ja andmed kemikaali muundumise kohta, sealhulgas biolagunduvus vees.

10. On vaja teada uuritava kemikaali lahustuvust vees, jaotuskoefitsienti süsteemis oktanool/vesi (P_{ow}) ja aururõhku, ning kemikaali sisalduse määramiseks katselahuses tuleks kasutada valideeritud meetodit, mille puhul on teada kemikaali tuvastamise tõhusus ja meetodi määramispiir.

KATSE NÕUETEKOHASUS

11. Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised kriteeriumid.

— Kontrollkultuuri biomass peab 72-tunnise katse kestel olema eksponentsiaalselt suurenenud vähemalt 16 korda. Sellele vastav kasvu erikiirus ööpäevas on 0,92. Kõige sagedamini kasutatavate liikide puhul on kasvukiirus tavaliselt palju suurem (vt 2. liide). See kriteerium ei pea olema täidetud, kui kasutatakse 2. liites loetletud liikidest aeglasemalt kasvavaid liike. Sellisel juhul tuleb katseaega pikendada nii, et kontrollkultuuri biomass kasvaks vähemalt 16 korda, kusjuures kasv peab kogu katse vältel olema eksponentsiaalne. Piiramatu eksponentsiaalse kasvu tagamiseks kogu katse vältel võib katse kestust lühendada, nii et see on minimaalselt 48 tundi, kui selle ajaga saavutatakse biomassi nõutav 16-kordne kasv.

— Kontrollkultuurides ajavahemike kaupa (72-tunnise katse puhul katsepäevad 0–1, 1–2 ja 2–3) arvutatud kasvu erikiiruste keskmine variatsioonikordaja (vt 1. liide, mõiste „variatsioonikordaja”) ei tohi olla üle 35 %. Kasvu erikiiruse arvutamist ajavahemike kaupa kirjeldatakse punktis 49. Seda kriteeriumi rakendatakse paralleelsete kontrollkultuuride kohta arvutatud keskmise variatsioonikordaja suhtes.

— Katsetes *Pseudokirchneriella subcapitata* ja *Desmodesmus subspicatus*'ega ei tohi paralleelsete kontrollkultuuride keskmise kasvu erikiiruse variatsioonikordaja olla kogu katse kestel suurem kui 7 %. Harvemini kasutatavate muude liikide puhul ei tohi see väärtus olla üle 10 %.

VÕRDLUSKEMIKAAL

12. Katsemeetodi kontrollimiseks võib kasutada rahvusvahelises võrdlusuuringus (1) kasutatud võrdluskemikaale, näiteks 3,5-diklorofenooli. Rohevetikate puhul võib võrdluskemikaalina kasutada ka kaaliumdikromaati. Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas.

KATSEMEETODI KASUTATAVUS

13. Käesolev katsemeetod on kõige hõlpsamalt kasutatav vees lahustuvate kemikaalide puhul, mis katsetingimustes tõenäoliselt püsivad vesilahuses. Kui uuritav kemikaal on lenduv, tugevasti adsorbeeruv, värviline või vees raskesti lahustuv või võib mõjutada toit- või mineraalainete kättesaadavust

▼M6

söötmes, võib olla vaja teha kirjeldatud katsemeetodis teatavaid muudatusi (nt kasutada suletud süsteemi või valmistada katsenõud eelnevalt ette). Juhendid mõne asjakohase muudatuse tegemiseks on esitatud allikates 2, 3 ja 4.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Seadmed

14. Katsenõud ja muud seadmed, mis puutuvad kokku katselahustega, peaksid olema üleni klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Seadmed peavad olema hoolikalt pestud, et tagada vetikate kasvu või katselahuste koostist mõjutada võivate orgaaniliste ja anorgaaniliste saasteainete puudumine.

15. Katsenõuna kasutatakse tavaliselt klaaskolbi, mis on piisavalt suur, et katse ajal saaks mõõtmisteks võtta küllaldases mahus kultuuri ja oleks tagatud piisav CO_2 massiülekanne atmosfäärist (vt punkt 30). Tuleb silmas pidada, et vedeliku maht peab olema analüüside tegemiseks piisav (vt punkt 37).

16. Lisaks võib vaja minna järgmisi seadmeid.

— Kultiveerimisseade: soovitatav on kasutada kappi või kambrit, mis võimaldab hoida inkubatsioonitemperatuuri täpsusega ± 2 °C.

— Fotomeetrid: on oluline silmas pidada, et valgustustiheduse mõõtmise meetod ja eriti anduri (kollektori) tüüp võivad mõjutada mõõdetavat väärtust. Mõõtmiseks soovitatakse kasutada kerakujulist (4 π) andurit, mis reageerib nii ülalt- kui ka altpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale otsesele ja peegeldunud valgusele, või poolkerakujulist (2 π) andurit, mis reageerib ülaltpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele.

— Seade vetikate biomassi määramiseks. Rakkude arvu, mis on kõige sagedamini kasutatav vetikate biomassi asendusparameeter, võib määrata elektroonilise osakeste loenduriga, mikroskoobi ja loenduskambriga või läbivoolutsütomeetriga. Muid biomassi asendusparameetreid võib mõõta läbivoolutsütomeetri, fluorimeetri, spektrofotomeetri või kolorimeetri abil. On kasulik arvutada kordaja, mille abil saab rakkude arvu teisendada kuivmassiks. Spektrofotomeetri kasutamisel võib biomassi väikese kontsentratsiooni juures olla kasutuskõlblike mõõtmistulemuste saamiseks vaja küvette, milles valguse teepikkus on vähemalt 4 cm.

Katseorganismid

17. Võib kasutada vabalt ujuvaid mitme liigi mikrovetikaid ja tsüanobaktereid. On tõendatud, et käesoleva meetodi kohane katse käik sobib 2. liites loetletud tüvede puhul.

18. Muu liigi organismide kasutamisel tuleb märkida asjaomane tüvi ja/või organismi päritolu. Tuleb tõendada, et valitud katsevetikate kasv on kohaldatavates tingimustes kogu katse vältel eksponentsiaalne.

Sööde

19. Soovitatakse kasutada kas OECD söödet või söödet AAP. Nende söötmete koostis on esitatud 3. liites. Tuleb silmas pidada, et nende söötmete pH algväärtus ja puhverdusvõime (pH tõusu kompenseerimise võime) on erinevad. Seepärast võivad katsetulemused sõltuda kasutatud söötmest, eriti kui uuritav kemikaal võib moodustada ioone.

▼M6

20. Teatavatel juhtudel, näiteks kui uuritakse metalle ja kelaativaid kemikaale või kui katsed tehakse eri pH väärtuste juures, võib olla vaja söötme koostist muuta. Sellist muudetud söödet tuleks üksikasjalikult kirjeldada ja selle kasutamist põhjendada (3, 4).

Biomassi algkontsentratsioon

21. Biomassi algkontsentratsioon peab kõigis katsekultuurides olema sama ja piisavalt väike, et võimaldada eksponentsiaalset kasvu kogu inkubatsiooniaja kestel, ilma et tekiks toitainete ammendumise ohtu. Biomassi algkontsentratsioon kuivmassina ei tohiks olla suurem kui 0,5 mg/l. Soovitatakse kasutada järgmisi rakkude algkontsentratsioone:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 – 10^4$ rakku/ml;
Desmodesmus subspicatus:	$2 – 5 \times 10^3$ rakku/ml;
Navicula pelliculosa:	10^4 rakku/ml;
Anabaena flos-aquae:	10^4 rakku/ml;
Synechococcus leopoliensis:	$5 \times 10^4 – 10^5$ rakku/ml.

Uuritava kemikaali kontsentratsioon

22. Kontsentratsioonivahemiku, mille puhul mõju tõenäoliselt avaldub, võib määratleda sellise vahemiku leidmiseks tehtud katsete tulemuste põhjal. Lõpliku katse tegemisel kasutatakse vähemalt viit kontsentratsiooni, mis moodustavad geomeetrilise jada, mille tegur ei ole suurem kui 3,2. Kui uuritava kemikaali mõju sõltuvus kontsentratsioonist on nõrk, võib olla õigustatud suurema teguri kasutamine. Kontsentratsioonide jada peaks eelistatult hõlmama vahemikku, mille puhul vetikate kasvukiirus väheneb 5–75 % võrra.

Paralleel- ja kontrollkultuurid

23. Katseplaanis tuleks ette näha kolm paralleelkultuuri iga kasutatava kontsentratsiooni kohta. Kui ei nõuta täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) kindlakstegemist, võib katseplaani muuta nii, et suurendatakse kasutatavate kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelkultuuride arvu iga kontsentratsiooni kohta. Paralleelseid kontrollkultuure peab olema vähemalt kolm ja parimal juhul võiks neid olla kaks korda rohkem kui paralleelkultuure iga kasutatava kontsentratsiooni kohta.

24. Uuritava kemikaali kontsentratsioonide määramiseks võib valmistada eraldi katselahuste seeria (vt punktid 36 ja 38).

25. Kui uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatakse lahustit, tuleb katseplaanis ette näha täiendavad kontrollkultuurid, mis sisaldavad lahustit samas kontsentratsioonis kui uuritava kemikaaliga kultuurid.

Inokulum-kultuuri valmistamine

26. Et võimaldada katsevetikatel kohaneda katsetingimustega ja tagada, et katselahuste inokuleerimisel on vetikad eksponentsiaalse kasvu faasis, valmistatakse 2–4 päeva enne katse algust katsesöötmel põhinev inokulum-kultuur. Vetikate biomassi kogust tuleks kohandada nii, et inokulum-kultuuris oleks enne katse algust ülekaalus eksponentsiaalne kasv. Inokulum-kultuuri inkubeeritakse samades tingimustes kui katsekultuure. Et veenduda, et katses

▼M6

kasutatav tüvi kasvab kultiveerimistingimustes normaalselt, mõõdetakse biomassi suurenemist inokulum-kultuuris. Üks vetikate kultiveerimise meetodi näide on esitatud 4. liites. Rakkude sünkroonse jagunemise ärahoidmiseks katse ajal võib olla vajalik inokulum-kultuuri teistkordne ümberkülvamine.

Katselahuste valmistamine

27. Kõigis katselahustes peab söötme kontsentratsioon ja katsevetikate biomassi algkontsentratsioon olema ühesugune. Tavaliselt valmistatakse valitud kontsentratsiooniga katselahused uuritava kemikaali põhilahuse, söötme ja inokulum-kultuuri segamise teel. Põhilahuse saamiseks lahustatakse uuritav kemikaal tavaliselt katsesöötmes.

28. Vees raskesti lahustuvate kemikaalide lisamiseks katsesöötmesse võib kasutada lahusteid, näiteks atsetooni, *t*-butüülalkoholi või dimetüülformamiidi (2, 3). Lisatud lahusti kontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 100 µl/l ja see peaks olema sama kõigis katseseeria kultuurides, sealhulgas kontrollkultuurides.

Inkubeerimine

29. Katsenõud suletakse õhku läbi laskvate korkidega. Nõusid loksutatakse ja need asetatakse kultiveerimisseadmesse. Katse ajal on vaja hoida vetikaid suspensioonis ja soodustada CO_2 ülekannet lahusesse. Selleks tuleks kultuure pidevalt loksutada või segada. Kultuure tuleks kasvatada temperatuurivahemikus 21–24 °C ning temperatuuri tuleks hoida täpsusega ± 2 °C. Kui kasutatakse 2. liites loetlemata liike (nt troopilised liigid), võib valida kõrgema temperatuuri, kui see ei takista nõuetele vastavuse kriteeriumide täitmist. Kolvid soovitatakse paigutada inkubaatoris juhuslikult ja muuta iga päev nende paigutust.

30. Katse ajal ei tohiks kontrollsöötme pH tõusta rohkem kui 1,5 ühiku võrra. Kui uuritakse metalle või kemikaale, mis katses kasutatavale pH-le lähedasel pH väärtusel osaliselt ioniseeruvad, võib reprodutseeritavate ja üheselt tõlgendatavate tulemuste saamiseks olla vaja piirata pH muutumise ulatust. Tehniliselt on võimalik saavutada olukord, kus pH muutus on väiksem kui 0,5 ühikut, kui tagatakse piisav CO_2 massiülekanne ümbritsevast õhust katselahusesse, näiteks loksutamiskiiruse suurendamise teel. Teine võimalus on vähendada CO_2 tarvet, vähendades algset biomassi või lühendades katse kestust.

31. Pinda, kus kultuure inkubeeritakse, tuleks valgustada pidevalt ja ühtlaselt luminofoorlambiga, mille valgus on näiteks külmvalge või päevavalguse spektriga. Vetikate ja tsüanobakterite tüvede valgusevajadus on erinev. Valgustustihedus tuleks valida lähtuvalt kasutatavast katseorganismist. Soovitatavate rohevetikaliikide puhul valitakse valgustustiheduseks katselahuste tasapinnal 60–120 µE m^{-2} s^{-1}, mõõdetuna sobiva anduri abil fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus 400–700 nm. Mõne liigi, eriti *Anabaena flos-aquae* tsüanobakterid kasvavad hästi väiksema valgustustiheduse juures ja suurem valgustustihedus võib neid kahjustada. Sellise liigi puhul tuleks valida keskmiseks valgustustiheduseks 40–60 µE m^{-2} s^{-1}. (Luksides kaliibritud fotomeetri puhul vastab külmvalge valgustustiheduse vahemikule 60–120 µE m^{-2} s^{-1} vahemik 4 440–8 880 luksi.) Valgustustihedus inkubatsioonipinnal ei tohi hälbida keskmisest valgustustihedusest rohkem kui ± 15 %.

▼M6

Katse kestus

32. Katse kestab tavaliselt 72 tundi. Võib siiski kasutada ka lühema või pikema kestusega katseid tingimusel, et on võimalik täita kõiki punkti 11 kohaseid nõuetele vastavuse kriteeriume.

Mõõtmised ja analüüsid

33. Vetikate biomassi igas kolvis määratakse katse ajal vähemalt üks kord ööpäevas. Kui mõõtmiseks kasutatakse katselahusest pipetiga võetud väikesi vedelikukoguseid, ei viida neid enam katselahusesse tagasi.

34. Biomassi mõõdetakse kas mikroskoobi abil rakkude loendamise teel või elektroonilise osakeste loenduriga (määratakse rakkude arv ja/või biomaht). Võib kasutada ka alternatiivmeetodeid, näiteks läbivoolutsütomeetriat, klorofülli fluorestsentsi määramist *in vitro* või *in vivo* (5, 6) või optilise tiheduse mõõtmist, kui on võimalik tõendada, et katses esinevas biomassivahemikus on asjaomaste parameetrite ja biomassi vahel piisav korrelatsioon.

35. Lahuste pH-d mõõdetakse katse alguses ja lõpus.

36. Kui on olemas meetod uuritava kemikaali määramiseks katses kasutatavas kontsentratsioonivahemikus, tuleks kontrollida kemikaali algsisaldust katselahuses ja selle sisalduse püsimist katse vältel.

37. Kui kontsentratsiooni muutus katse vältel on eeldatavalt alla 20 % nominaalväärtusest, võib piisata uuritava kemikaali sisalduse määramisest katse alguses ja lõpus ühel väiksel ja ühel suurel kontsentratsioonil ja eeldatavale EC_{50}-le lähedasel kontsentratsioonil. Kui kontsentratsioon tõenäoliselt ei püsi vahemikus 80–120 % nominaalväärtusest, soovitatakse määrata uuritava kemikaali sisaldus katse alguses ja lõpus igal kasutataval kontsentratsioonil. Kui uuritav kemikaal on lenduv, ebapüsiv või tugevasti adsorbeeruv, soovitatakse katse ajal võtta määramiseks iga 24 tunni järel lisaproove, et paremini jälgida uuritava kemikaali kadu. Selliste kemikaalide puhul võib olla vaja kasutada täiendavaid paralleelkultuure. Kõikidel juhtudel on uuritava kemikaali sisaldust igal kasutataval kontsentratsioonil vaja määrata ainult ühes paralleelkultuuris (või paralleelkultuuridest kokku segatud ühes proovis).

38. Söötmeid, mis on spetsiaalselt valmistatud kokkupuutekontsentratsiooni määramiseks katse ajal, tuleks käidelda täpselt samal viisil kui katses kasutatavaid söötmeid, st need inokuleeritakse vetikatega ja neid inkubeeritakse samades tingimustes. Kui on vaja määrata uuritava lahustunud kemikaali sisaldust, võib olla vaja eraldada söötmest vetikad. Eraldamiseks tuleks eelistatult kasutada tsentrifuugimist väikesel kiirendusel, millest piisab vetikate sadestamiseks.

39. Kui on tõendatud, et uuritava kemikaali sisaldus ei kõigu katse vältel nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtusega võrreldes rohkem kui ± 20 %, võib tulemuste analüüsimisel võtta aluseks nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtuse. Kui kõrvalekalle sisalduse nominaalväärtusest või mõõdetud algväärtusest on suurem kui ± 20 %, tuleks tulemuste analüüsimisel võtta aluseks katse vältel esinevate väärtuste geomeetriline keskmine või mõni uuritava kemikaali sisalduse vähenemist kirjeldav mudel (3, 7).

▼M6

40. Vetikate kasvu pidurdumise katse on dünaamilisem kui enamik muid veeorganismidele avalduva lühiajalise mürgisuse määramise katseid. Seepärast võib tegeliku kokkupuutekontsentratsiooni kindlakstegemine olla raskendatud, eriti kui uuritakse adsorbeeruvat kemikaali väiksel kontsentratsioonil. Sellisel juhul ei tähenda uuritava kemikaali kadu lahusest seoses vetikate suurenevale biomassile adsorbeerumisega, et kemikaal on katsesüsteemist kadunud. Katsetulemuste analüüsimisel tuleks kontrollida, kas uuritava kemikaali sisalduse vähenemisega katse ajal kaasneb kasvu pidurdumise vähenemine. Kui see on nii, võib kaaluda uuritava kemikaali sisalduse vähenemist kirjeldava sobiva mudeli rakendamist (7). Kui kasvu pidurdumine ei vähene, võib olla sobiv võtta tulemuste analüüsimisel aluseks nominaalsisaldus või mõõdetud algsisaldus.

Muud vaatlused

41. Inokulum-kultuuri tuleks vaadelda mikroskoobi all, et veenduda, et kultuur näeb välja normaalne ja elujõuline, ning katse lõpus tuleks vetikakultuuri samal viisil uurida morfoloogiliste muutuste tuvastamiseks, mis võivad olla põhjustatud kokkupuutest uuritava kemikaaliga.

Piirsisalduskatse

42. Teatavatel juhtudel, näiteks kui eelkatsest selgub, et uuritav kemikaal ei avalda kontsentratsioonil kuni 100 mg/l või katsesöötmes lahustuvuse piirkontsentratsioonil (olenevalt sellest, kumb on väiksem) mürgist mõju, võib teha piirsisalduskatse, milles võrreldakse kasvu kontrollrühmas ja ühes katserühmas, kus kemikaal esineb kontsentratsioonis 100 mg/l või lahustuvuse piirkontsentratsioonis. Piirsisalduskatse tegemisel soovitatakse tungivalt määrata ka kokkupuutekontsentratsioon. Piirsisalduskatse puhul kohaldatakse kõiki eespool kirjeldatud katsetingimusi ja nõuetele vastavuse kriteeriume; ainsa erandina nähakse ette, et uuritava kemikaaliga paralleelkultuure peaks olema vähemalt kuus. Kontroll- ja katserühmas mõõdetud muutujate analüüsil võib keskväärtusi võrrelda statistilise testi (nt Studenti t-testi) abil. Kui kahe rühma andmete hajuvused on erinevad, tuleks kasutada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testi.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Kasvukõverate koostamine

43. Katsenõus oleva biomassi kogust võib väljendada mõõtmisel kasutatud asendusparameetri (nt rakkude arv, fluorestsents) ühikutes.

44. Katse- ja kontrollkultuurides määratud biomassi ja uuritava kemikaali kontsentratsioonid ning mõõtmise ajad, mis registreeritakse vähemalt täistunni täpsusega, kantakse tabelisse ja nende andmete põhjal koostatakse kasvukõverad. Siin kirjeldatud esimeses etapis võib olla kasulik kasutada nii logaritmilist kui ka lineaarset skaalat, kuid logaritmiline skaala on kohustuslik ja võimaldab katse kestel esinevaid kasvukiiruse muutusi üldjuhul paremini esitada. Tuleb silmas pidada, et logaritmilisel skaalal saadakse eksponentsiaalse kasvu puhul sirge, mille tõus väljendab kasvu erikiirust.

45. Kasvukõverate abil kontrollitakse, kas kontrollkultuurid kasvavad kogu katse jooksul eksponentsiaalselt ja eeldatava kiirusega. Iga andmepunkti ja graafikute kuju hinnatakse kriitiliselt ning veendutakse, et töötlemata andmetes ei ole vigu ja katse on läbi viidud korrektselt. Eelkõige kontrollitakse andmepunkte, mille puhul kõrvalekalle näib tulenevat süstemaatilisest veast. Kui on võimalik tuvastada viga katse läbiviimisel või vea esinemist võib pidada väga tõenäoliseks, tähistatakse asjaomane andmepunkt võõrväärtusena ja jäetakse järgnevast statistilisest analüüsist välja. (Näiteks

▼M6

võib vetikate nullsisaldus ühes kahest või kolmest paralleelnõust osutada sellele, et inokuleerimine ei toimunud selles nõus õigesti või nõu ei olnud korralikult puhastatud.) Katseprotokollis esitatakse selgelt põhjus, miks teatav andmepunkt on võõrväärtusena analüüsist välja jäetud. Vastuvõetavaks põhjuseks loetakse ainult (harva esinevaid) vigu katse läbiviimisel, mitte aga vähest täpsust. Kõnealuse probleemi puhul on statistiliste meetodite kasutusvõimalused võõrväärtuste kindlakstegemiseks piiratud ja need ei asenda eksperdihinnangut. Katseandmete esitamisel graafikul või tabelis on soovitatav esitada koos teiste andmepunktidega ka võõrväärtustele vastavad (ja sellisena tähistatud) punktid.

Uuritavad muutujad

46. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju vetikate kasvule. Kuna eelistused ja regulatiivsed vajadused eri jurisdiktsioonides on erinevad, kirjeldatakse käesolevas katsemeetodis kahte uuritavat muutujat. Et tagada katsetulemuste vastuvõetavus kõikides jurisdiktsioonides, tuleks vaadeldava mõju hindamisel kasutada mõlemat allpool kirjeldatud muutujat (a ja b).

a) Keskmine kasvu erikiirus: see uuritav muutuja arvutatakse katse ajal toimunud biomassi juurdekasvu logaritmitud väärtuste alusel ja seda väljendatakse kasvukiirusena ööpäevas.

b) Saagis: see uuritav muutuja on biomassi koguste vahe katse lõpus ja alguses.

47. Tuleks silmas pidada, et nende kahe uuritava muutuja abil arvutatud mürgisuse väärtused ei ole võrreldavad, ning seda erinevust tuleb katsetulemuste kasutamisel arvesse võtta. Käesolevas katsemeetodis sätestatud tingimuste kohase katse puhul on keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad EC_x väärtused (E_rC_x) üldjuhul suuremad kui saagisel põhinevad väärtused (E_yC_x), kuna asjaomaste lähenemisviiside matemaatiline alus on erinev. Seda erinevust ei tohiks tõlgendada kahe kõnealuse uuritava muutuja tundlikkuse erinevusena; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad. Keskmise kasvu erikiiruse määratlus põhineb vetikate üldisel piiramatul eksponentsiaalsel kasvul kultuuris, kusjuures mürgisust hinnatakse kasvukiirusele avalduva mõju alusel ja see ei olene kontrollkultuuri absoluutsest kasvu erikiirusest, kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera tõusust ega katse kestusest. Kui uuritav muutuja on aga saagis, sõltuvad tulemused kõikidest eespool nimetatud lisamuutujatest. E_yC_x väärtus sõltub katses kasutatud vetikaliigi kasvu erikiirusest ja maksimaalsest kasvu erikiirusest, mis võib eri vetikaliikidel ja isegi sama liigi eri tüvedel olla erinev. Seda uuritavat muutujat ei tohiks kasutada, kui võrreldakse vetikaliikide või -tüvede tundlikkust mürgiste kemikaalide suhtes. Ehkki keskmise kasvu erikiiruse kasutamine mürgisuse hindamiseks on teaduslikult paremini põhjendatud, käsitletakse käesolevas katsemeetodis mõnes riigis kehtivate regulatiivsete nõuete järgimise võimaldamiseks ka saagisel põhinevat mürgisuse hindamist.

Keskmine kasvukiirus

48. Keskmine kasvu erikiirus teataval ajavahemikul arvutatakse kontrollrühma ja katserühmade iga nõu puhul biomassi juurdekasvu logaritmitud väärtuse põhjal vastavalt järgmisele võrrandile:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{ööpäevas}^{-1}) \qquad [1],$$

kus

μ_{i-j} on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul *i–j*,

X_i on biomass ajahetkel *i* ja

X_j on biomass ajahetkel *j*.

Kontrollrühma ja iga katserühma puhul arvutatakse kasvukiiruse keskmine väärtus ja tulemuste hajuvus.

49. Arvutatakse keskmine kasvu erikiirus kogu katseaja (tavaliselt päevad 0–3) jooksul, võttes aluseks inokuleerimiseks kasutatud biomassi nominaalväärtuse, mitte mõõdetud algväärtuse, sest tavaliselt saadakse sel viisil täpsem tulemus. Biomassi mõõdetud algsisaldust võib siiski kasutada juhul, kui biomassi mõõtmise seade (nt läbivoolutsütomeeter) võimaldab määrata inokulumi biomassi piisavalt täpselt. Kasvu erikiiruse hindamiseks ajavahemike kaupa arvutatakse see katse vältel iga ööpäeva kohta (katsepäevad 0–1, 1–2 ja 2–3) ja kontrollitakse, kas kontrollkultuuri kasvukiirus püsib muutumatuna (vt nõuetele vastavuse kriteeriumid punktis 11). Kui kasvu erikiirus esimesel katsepäeval on üldisest keskmisest väärtusest oluliselt väiksem, võib see osutada ootefaasi esinemisele. Kontrollkultuuri ootefaasi saab minimeerida või praktiliselt kõrvaldada eelkultuuri õige paljundamisega; uuritava kemikaaliga kultuuride puhul aga võib ootefaas osutada taastumisele esialgsest mürgise mõjuga seotud stressist või uuritava kemikaali sisalduse vähenemisele seoses esialgse kokkupuute järgse kemikaali kaoga (muu hulgas vetikate biomassile adsorbeerumise tõttu). Seega võib kasvukiiruse hindamist ajavahemike kaupa kasutada uuritava kemikaali mõju jälgimiseks kokkupuuteaja jooksul. Ajavahemike kaupa arvutatud kasvukiiruste ja keskmise kasvukiiruse vahelised olulised erinevused osutavad pidevast eksponentsiaalsest kasvust kõrvalekaldumisele ning sel juhul on vaja kasvukõveraid üksikasjalikult uurida.

50. Uuritavat kemikaali sisaldava iga paralleelkultuuri puhul arvutatakse kasvukiiruse pidurdumise määr protsentides järgmise võrrandi abil:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

kus

$\%\ I_r$ on keskmise kasvu erikiiruse pidurdumise määr protsentides,

μ_C on keskmise kasvu erikiiruse (μ) keskväärtus kontrollrühmas ja

μ_T on keskmine kasvu erikiirus uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris.

51. Kui katselahuste valmistamiseks kasutatakse lahusteid, tuleks pidurdumise määr arvutada lahustit sisaldavate, mitte lahustivabade kontrollkultuuride põhjal.

Saagis

52. Saagis arvutatakse kontrollrühma ja katserühmade iga nõu kohta, lahutades katse lõpus määratud biomassi kogusest biomassi algkoguse. Kontrollrühmas ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse keskmine saagis ning tulemuste hajuvus. Saagise vähenemise määra protsentides ($\%\ I_y$) võib uuritavat kemikaali sisaldava iga paralleelkultuuri puhul arvutada järgmiselt:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3],$$

kus

$\%\ I_y$ on saagise vähenemise määr protsentides,

Y_C on keskmine saagis kontrollrühmas ja

Y_T on saagis uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris.

Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera koostamine

53. Koostatakse graafik, mis väljendab kasvukiiruse pidurdumise või saagise vähenemise protsentuaalse määra sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsiooni logaritmitud väärtusest; graafikut uuritakse üksikasjalikult, jättes kõrvale kõik esimeses etapis võõrväärtustena välja jäetud andmepunktid. Läbi punktide tõmmatakse käsitsi või arvutipõhise interpoleerimise abil sujuv kõver, mis annab esmapildi kontsentratsiooni ja mõju vahelisest seosest, ning seejärel rakendatakse üksikasjalikumat lähenemisviisi, soovitatavalt mõnda arvutipõhist statistilist meetodit. Olenevalt andmete kasutusotstarbest, kvaliteedist (täpsusest) ja hulgast ning andmeanalüüsi meetodite kättesaadavusest võidakse andmete analüüsimine sellega lõpetada (teatavatel juhtudel on see õigustatud) ja lugeda silma järgi koostatud kõveralt kõige olulisemad näitajad EC_{50} ja EC_{10} (ja/või EC_{20}) (vt ka stimuleerivat mõju käsitlev punkt allpool). Mõjuvad põhjused statistiliste meetodite kasutamisest loobumiseks võivad olla näiteks järgmised:

— andmed ei võimalda saada arvutipõhiste meetoditega usaldusväärsemaid tulemusi kui eksperdihinnangu alusel saadud tulemused – sellisel juhul ei pruugi mõned arvutiprogrammid üldse anda usaldusväärseid lahendeid (iteratsioonid ei pruugi koonduda jne);

— olemasolevad arvutiprogrammid ei võimalda piisavalt hästi hinnata stimuleerivat mõju kasvule (vt allpool).

Statistilised meetodid

54. Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. On võimalik kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast mõjuandmete lineariseerivat teisendamist näiteks probit-, logit- või Weibulli jaotuse kujule (8), kuid tuleks siiski eelistada mittelineaarse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kasvu täielikule pidurdumisele või pidurdumise täielikule puudumisele lähedases olukorras võib kõnealune teisendamine andmevigu võimendada ja analüüsi segada (8). Tuleks silmas pidada, et probit-, logit- või Weibulli teisendusel põhinevad standardsed analüüsimeetodid on ette nähtud binaarsete tunnuste (nt suremus või elulemus) analüüsimiseks ning neid tuleb kasvu- või biomassiandmete analüüsimiseks kohandada. Konkreetsed meetodid EC_x väärtuste leidmiseks pidevate andmete alusel on esitatud allikates 9, 10 ja 11. Mittelineaarse regressiooni kasutamist on üksikasjalikult käsitletud 5. liites.

55. Kummagi uuritava muutuja puhul arvutatakse kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera põhjal EC_x hinnangulised väärtused. Võimaluse korral tuleks määrata iga hinnangulise väärtuse usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Mõjuandmete sobivust regressioonimudeliga tuleks hinnata graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsi tegemisel tuleks kasutada mitte katserühmade andmete keskväärtusi, vaid igas üksikus paralleelkultuuris saadud

▼M6

väärtusi. Kui andmete suure hajuvuse tõttu on kõvera mittelineaarne lähendamine raske või võimatu, võib probleemi lahendamiseks kasutada regressioonanalüüsi puhul siiski rühmade keskväärtusi – selle praktilise lähenemisviisiga vähendatakse eeldatavate võõrväärtuste mõju. Sellise võimaluse kasutamise korral tuleks katseprotokolli lisada märkus, et tavapärasest analüüsimeetodist kalduti kõrvale, kuna iga üksiku paralleelkultuuri andmetest lähtuv kõvera lähendamine ei andnud head tulemust.

56. Kui olemasolevad regressioonimudelid ja -meetodid ei ole katseandmete jaoks sobivad, võib EC_{50} hinnangulise väärtuse ja usalduspiiride leidmiseks kasutada ka lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (13).

57. Et teha kasvukiiruse puhul kindlaks uuritava kemikaali vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) ja selle alusel ka täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC), on vaja võrrelda katserühmade keskväärtusi dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetoditega. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskväärtust võrreldakse seejärel kontrollrühmas saadud keskväärtusega, kasutades sobivat mitmese võrdluse või trenditesti meetodit. Selleks võib sobida Dunnetti või Williamsi test (12, 14, 15, 16, 17). Tuleb hinnata, kas kehtib dispersioonanalüüsi eeldus, et hajuvus on homogeenne. Seda võib teha graafiku alusel või formaalse testi (17), näiteks Levene'i või Bartletti testi abil. Kui hajuvuse homogeensuse eeldus ei kehti, võib mõnikord homogeensuse saavutada andmete logaritmilise teisendamisega. Kui hajuvuse heterogeensus on väga suur ja seda ei saa teisendamisega korrigeerida, tuleks kaaluda mõne muu meetodi, näiteks muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i trenditesti kasutamist. Lisajuhised NOEC väärtuse määramiseks on esitatud allikas 11.

58. Uute teadussaavutuste põhjal on soovitatud loobuda NOEC väärtuse mõistest ja asendada see regressiooni teel leitud hinnangulise näitajaga EC_x. Kõnealuse vetikatega tehtava katse jaoks ei ole sobivat x väärtust veel kindlaks määratud. Sobiv väärtuste vahemik näib olevat 10–20 % (olenevalt uuritavast muutujast) ning soovitatavalt tuleks esitada nii EC_{10} kui ka EC_{20}.

Stimuleeriv mõju kasvule

59. Mõnikord täheldatakse väikestel kontsentratsioonidel stimuleerivat mõju kasvule (negatiivne pidurdumine). Selle põhjuseks võib olla hormees (mürgise kemikaali stimuleeriv mõju) või kasutatavasse minimaalsöötmesse stimuleeriva kasvufaktori lisamine koos uuritava kemikaaliga. Tuleb silmas pidada, et anorgaaniliste toitainete lisamine ei tohiks avaldada otsest mõju, sest katsesöötmes peaks kogu katse vältel olema tagatud toitainete liig. Tavaliselt võib EC_{50} arvutamisel väikeste koguste stimuleeriva mõju arvestamata jätta, kui see mõju ei ole väga suur. Kui stimuleeriv mõju on väga suur või on vaja leida EC_x, mille puhul x väärtus on väike, võib olla vaja kasutada erimeetodeid. Võimaluse korral tuleks hoiduda stimuleerivat mõju kajastavate tulemuste väljajätmisest andmeanalüüsil; kui olemasolev kõvera lähendamise tarkvara ei võimalda nõrka stimuleerivat mõju arvesse võtta, võib kasutada lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega. Kui stimuleeriv mõju on väga tugev, võib kaaluda hormeesimudeli kasutamist (18).

Kasvu pidurdumine muul põhjusel kui mürgisus

60. Valgust neelavad uuritavad kemikaalid võivad vähendada kasvukiirust kättesaadava valgushulga vähendamise kaudu. Seda tüüpi füüsikalist mõju tuleks katsetingimuste muutmisega mürgisest mõjust lahus hoida ja eraldi kirjeldada. Asjaomased juhised on esitatud allikates 2 ja 3.

KATSEPROTOKOLL

61. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

▼**M6**

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline iseloomustus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, sealhulgas vees lahustuvuse piirkontsentratsioon;

— kemikaali identifitseerimisandmed (nt CASi number) ja puhtus (lisandid).

Katseliik:

— tüvi, tarnija või päritolu ja kasutatud kultiveerimistingimused.

Katsetingimused:

— katse alustamise kuupäev ja kestus;

— katseplaani kirjeldus: katsenõud, kultuuride maht, biomassi tihedus katse alguses;

— söötme koostis;

— kasutatud kontsentratsioonid ja paralleelkultuurid (paralleelkultuuride arv, kasutatud kontsentratsioonide arv ja geomeetrilise jada tegur);

— katselahuste valmistamise, sealhulgas lahustite jms kasutamise kirjeldus;

— kultiveerimisseade;

— valgustustihedus ja valguse kvaliteet (valgusallikas, valguse ühtlus);

— temperatuur;

— kasutatud kontsentratsioonid: nominaalne sisaldus ja katsenõudes oleva uuritava kemikaali sisalduse määramise tulemused; tuleks märkida asjaomase meetodi tõhusus kemikaali tuvastamisel ja meetodi määramispiir katselahuses;

— kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist;

— biomassi määramise meetod ning tõendid mõõdetava parameetri ja kuivmassi vahelise korrelatsiooni kohta.

Tulemused:

— pH väärtused katse alguses ja lõpus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil;

— biomass igas kolvis igas ajapunktis ning biomassi mõõtmise meetod;

— kasvukõverad (biomassi ajas muutumise graafikud);

— uuritavate muutujate arvutatud väärtused igas uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris ning paralleelkultuuride andmete keskväärtused ja variatsioonikordajad;

— kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;

▼**M6**

— uuritavate muutujate kaudu määratud mürgisuse näitajad – nt EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} – ja vastavad usaldusvahemikud; asjaomaste andmete olemasolu korral LOEC ja NOEC ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;

— dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamise korral mõju määr, mida on võimalik tuvastada (nt väikseim oluline erinevus);

— katserühma mis tahes kultuuris täheldatud stimuleeriv mõju kasvule;

— mis tahes muu täheldatud mõju, nt vetikate morfoloogilised muutused;

— tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

(1) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). ISO 8692: Water quality – Algal growth inhibition test.

(2) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1998). ISO/DIS 14442: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water.

(3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(4) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1998). ISO 5667-16: Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) Mayer, P., Cuhel, R., ja Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Res*. 31: 2525–2531.

(6) Slovacey, R. E., ja Hanna, P. J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll. *Limnol. Oceanogr*. 22: 919–925.

(7) Simpson, S. L., Roland, M. G. E., Stauber, J. L., ja Batley, G. E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem*. 22: 2073–2079.

(8) Christensen, E. R., ja Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Environ. Sci. Technol*. 19: 713–718.

(9) Nyholm, N., Sørensen, P. S., Kusk, K. O., ja Christensen, E. R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157–167.

(10) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485–1494.

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M6**

(12) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc*. 50: 1096–1121.

(13) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.

(15) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.

(16) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519–531.

(17) Draper, N. R., ja Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, teine väljaanne. Wiley, New York.

(18) Brain, P., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res*. 29: 93–96.

▼M6

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid ja lühendeid.

Biomass – populatsiooni elusaine kuivmass ruumalaühiku kohta, nt vetikate kuivmass milligrammides katselahuse liitri kohta. Tavaliselt tähendab „biomass" massi, kuid käesoleva katsemeetodi tähenduses on see mass ruumalaühiku kohta. Kuna käesoleva meetodi puhul mõõdetakse tavaliselt biomassi asendusparameetreid, näiteks rakkude arvu, fluorestsentsi vms, tähistatakse mõistega „biomass" ka kõnealuseid asendusparameetreid.

Kemikaal – aine või segu.

Variatsioonikordaja – mõõtühikuta suurus, mis iseloomustab asjaomase parameetri varieeruvust ning on määratletud standardhälbe ja keskväärtuse suhtarvuna. Seda võib väljendada ka protsentides. Paralleelsete kontrollkultuuride keskmise kasvu erikiiruse keskmine variatsioonikordaja tuleks arvutada järgmiselt:

1. ajavahemike kaupa, st iga ööpäeva kohta arvutatud kasvukiiruste põhjal leitakse asjaomase paralleelkultuuri keskmise kasvu erikiiruse variatsioonikordaja protsentides;

2. paralleelsete kontrollkultuuride puhul iga ajavahemiku ehk ööpäeva kohta arvutatud keskmise kasvu erikiiruse keskmise variatsioonikordaja leidmiseks arvutatakse eelmise punkti kohaselt leitud väärtuste keskmine.

EC_x – katsesöötmes lahustatud uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul katseorganismi kasv pidurdub x % (nt 50 %) võrra kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul (kui kokkupuuteaeg erineb katse tavapärasest või täiskestusest, tuleb täpselt märkida selle kestus). Kasvukiiruse või saagise alusel arvutatava EC väärtuse üheselt arusaadavaks tähistamiseks kasutatakse kasvukiiruse puhul tähist „E_rC" ja saagise puhul tähist „E_yC".

Sööde – täielik sünteetiline kasvukeskkond, milles katsevetikaid kasvatatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav kemikaal katsesöötmes.

Kasvukiirus (keskmine kasvu erikiirus) – biomassi logaritmiline suurenemine kokkupuuteperioodi jooksul.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) – väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ($p < 0,05$) kasvu pidurdavat mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peab kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil avalduv kahjulik mõju. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleb lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka NOEC) on valitud.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) – kontsentratsioon, mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool LOEC väärtust.

Uuritav muutuja – mürgisuse hindamiseks kasutatav muutuja, mis on tuletatud biomassi kirjeldava mõõdetud parameetri põhjal vastavalt asjakohasele arvutusmeetodile. Käesoleva katsemeetodi tähenduses on uuritavateks muutujateks kasvukiirus ja saagis, mis tuletatakse biomassi otsesel või asendusparameetrite kaudu mõõtmisel saadud andmete põhjal.

▼**M6**

Kasvu erikiirus – uuritav muutuja, mis on määratletud kui jälgitava parameetri (käesoleva katsemeetodi puhul biomass) väärtuste naturaallogaritmide vahe ja asjaomase ajavahemiku jagatis.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Saagis – kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetava muutuja väärtuste vahe, mis väljendab biomassi suurenemist katse vältel.

▼M6

2. liide

Tüved, mille sobivus käesoleva katsemeetodi puhul on tõendatud

Rohevetikad

Pseudokirchneriella subcapitata (varasem liiginimi *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (endine liiginimi *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Ränivetikad

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Tsüanobakterid

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Tüvekollektsioonid

Soovitatavad tüved on kättesaadavad ühest isendist saadud vetikakultuurina järgmistest kollektsioonidest (tähestikulises järjestuses):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110–2209
USA

CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
ÜHENDKUNINGRIIK

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
D-37073 Göttingen
SAKSAMAA

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

▼M6

Soovitatavate liikide organismide kuju ja omadused

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Kuju	Kõverdunud kruvijad eraldi rakud	Ovaalsed enamasti eraldi rakud	Kepikujulised rakud	Ovaalsete rakkude ahelad	Kepikujulised rakud
Mõõtmed (pikkus × läbimõõt), µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Raku ruumala (μm^3/rakk)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Raku kuivmass (mg/rakk)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Kasvukiirus (3) (ööpäevas)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0– 2,4

(1) Määratud elektroonilise osakeste loenduri abil.
(2) Arvutatud mõõtmete alusel.
(3) Kõige sagedamini täheldatav kasvukiirus OECD söötmes valgustustihedusel umbes 70 µE m^{-2} s^{-1} ja temperatuuril 21 °C.

Konkreetsed soovitused soovitatavate katseliikide kultiveerimiseks ja käitlemiseks

Pseudokirchneriella subcapitata ja Desmodesmus subspicatus

Nende rohevetikate säilitamine mitmesugustes söötmetes on üldjuhul hõlbus. Teavet sobivate söötmete kohta saab vetikakultuuride kollektsioonidest. Rakud on tavaliselt üksteisest eraldi ja nende kontsentratsiooni on kerge määrata elektroonilise osakeste loenduri või mikroskoobi abil.

Anabaena flos-aquae

Tüvikultuuri säilitamiseks võib kasutada eri söötmeid. Kultuuri uuendamisel on eriti tähtis ära hoida mittepideva kultuuri kasvu väljumist logaritmilisest faasist, sest kultuuri taastamine on sellisel juhul raske.

Anabaena flos-aquae kokkukeerdunud rakuahelad moodustavad kogumikke. Nende rakukogumike suurus võib olenevalt kultiveerimistingimustest olla erinev. Kui biomassi määramiseks kasutatakse loendamist mikroskoobi abil või elektroonilist osakeste loendurit, võib olla vaja need kogumikud lõhkuda.

Rakuahelate lõhkumiseks võib osaproove töödelda ultraheliga, et vähendada loendamistulemuste varieeruvust. Kui osaproove töödeldakse ultraheliga kauem, kui on vaja rakuahelate lõhkumiseks väiksema pikkusega juppideks, võivad rakud hävida. Ultraheliga töötlemise intensiivsus ja kestus peab olema kõigi proovide puhul ühesugune.

Tulemuste varieeruvuse vähendamiseks hemotsütomeetriga loendamisel kasutatakse piisaval arvul väljasid (loendatakse vähemalt 400 rakku). See muudab rakkude kontsentratsiooni mikroskoobiga määramise usaldusväärsemaks.

Pärast hoolika ultrahelitöötluse abil rakuahelate lõhkumist võib *Anabaena* rakkude üldmahu määramiseks kasutada elektroonilist osakeste loendurit. Ultraheli energia tuleb reguleerida tasemele, mille puhul rakud jäävad terveks.

Katsenõude inokuleerimiseks kasutatava vetikasuspensiooni korralikuks läbisegamiseks ja homogeensuse tagamiseks kasutatakse keerissegistit või muud sobivat meetodit.

▼**M6**

Katsenõud tuleks paigutada orbitaal- või võnkloksuti plaadile ja loksutada neid kiirusel umbes 150 pööret minutis. *Anabaena* rakukogumike moodustumist võib takistada ka perioodilise loksutamisega. Kui rakukogumikud siiski tekivad, tuleb jälgida, et biomassi mõõtmiseks võetavad proovid oleksid representatiivsed. Vetikakogumike lõhkumiseks võib olla vaja kultuuri enne proovivõtmist tugevalt loksutada.

Synechococcus leopoliensis

Tüvikultuuri säilitamiseks võib kasutada eri söötmeid. Teavet sobivate söötmete kohta saab vetikakultuuride kollektsioonidest.

Synechococcus leopoliensiskasvab eraldi kepikujuliste rakkudena. Rakud on väga väikesed ning see raskendab biomassi mõõtmist rakkude mikroskoobi abil loendamise teel. Võib kasutada sellist elektroonilist osakeste loendurit, mis võimaldab loendada osakesi, mille väikseim läbimõõt on 1 μm. Võib kasutada ka fluorimeetrilist mõõtmist *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Tüvikultuuri säilitamiseks võib kasutada eri söötmeid. Teavet sobivate söötmete kohta saab vetikakultuuride kollektsioonidest. Tuleb silmas pidada, et sööde peab sisaldama silikaati.

Navicula pelliculosa võib teatavates kasvutingimustes moodustada rakukogumikke. Lipiidide sünteesi tõttu võivad vetikarakud mõnikord koguneda pindkilesse. Sel juhul tuleb biomassi määramiseks vajalike osaproovide võtmisel rakendada erimeetmeid, et tagada proovide representatiivsus. Kultuuri võib olla vaja tugevalt segada, kasutades näiteks keerissegistit.

▼**M6**

3. liide

Söötmed

Võib kasutada ühte järgmistest söötmetest.

— OECD sööde: OECD katsejuhendile nr 201 vastav originaalsööde, vastab ka standardile ISO 8692.

— USA Keskkonnakaitseameti sööde AAP, vastab ka USA Materjalide Katsetamise Ühingu standardile.

Nende söötmete valmistamisel tuleks kasutada analüütilise või reaktiivi puhtusastmega kemikaale ja deioniseeritud vett.

Söötme AAP (USA Keskkonnakaitseamet) ja OECD katsejuhendi nr 201 kohase söötme koostis

Koostisaine	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

EDTA ja raua moolisuhe on veidi suurem kui 1. See hoiab ära raua sadestumise ning samal ajal on kelaatide moodustumine raskmetallide ioonidega minimeeritud.

Kui katses kasutatakse ränivetikat *Navicula pelliculosa*, lisatakse kummalegi söötmele ainet $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ kontsentratsioonini 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

Söötme nõutav pH saavutatakse, kui söötme karbonaatsüsteem on tasakaalus CO_2 osarõhuga atmosfääriõhus. Temperatuuril 25 °C on pH väärtuse ja vesinikkarbonaadi molaarse kontsentratsiooni vaheline ligikaudne seos järgmine:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$.

$NaHCO_3$ kontsentratsioonil 15 mg/l on pH_{eq} 7,5 (sööde AAP) ja $NaHCO_3$ kontsentratsioonil 50 mg/l on pH_{eq} 8,1 (OECD sööde).

Elementide sisaldus katsesöötmes

Element	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

OECD söötme valmistamine

Toitaine	Sisaldus põhilahuses
Põhilahus 1: makrotoitained	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Põhilahus 2: raud	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Põhilahus 3: mikrotoitained	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Toitaine	Sisaldus põhilahuses
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Põhilahus 4: vesinikkarbonaat $NaHCO_3$ $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 g/l

Põhilahused steriliseeritakse membraanfiltrimise (keskmine poori läbimõõt 0,2 μm) või autoklaavimise (120 °C, 15 min) teel. Lahuseid hoitakse valguse eest kaitstult 4 °C juures.

Põhilahuseid 2 ja 4 ei autoklaavita, vaid need steriliseeritakse membraanfiltrimise teel.

Söötme valmistamiseks lisatakse veele vajalikus mahus põhilahuseid 1–4.

500 ml steriliseeritud veele lisatakse:

10 ml põhilahust 1;

1 ml põhilahust 2;

1 ml põhilahust 3;

1 ml põhilahust 4.

Lahuse ruumala viiakse steriliseeritud veega 1 000 milliliitrini.

Lahusel lastakse piisavalt kaua seista, et sööde saavutaks tasakaalu atmosfääris oleva süsihappegaasiga; vajaduse korral barboteeritakse filtritud steriilset õhku mõne tunni jooksul läbi lahuse.

Söötme AAP valmistamine

1. Umbes 900 milliliitrile deioniseeritud või destilleeritud veele lisatakse 1 ml iga põhilahust 2.1–2.7 ja saadud lahuse ruumala viiakse 1 liitrini.

2. Makrotoitainete põhilahuse valmistamiseks lahustatakse 500 ml deioniseeritud või destilleeritud vees järgmised kogused aineid. Reaktiividest 2.1, 2.2, 2.3 ja 2.4 võib valmistada ühe kombineeritud põhilahuse.

2.1.	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2.	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.
2.3.	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g.
2.4.	Mikrotoitainete põhilahus (vt punkt 3).	
2.5.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.
2.6.	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7.	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	7,500 g.
2.8.	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	vt märkus 1.

▼**M6**

Märkus 1: kasutatakse ainult katsetes ränivetikaliikidega. Võib lisada söötmesse otse (202,4 mg) või põhilahuse kujul, et saavutada söötmes räni lõppkontsentratsioon 20 mg/l.

3. Mikrotoitainete põhilahuse saamiseks lahustatakse 500 ml deioniseeritud või destilleeritud vees järgmised kogused aineid.

3.1.	H_3BO_3	92,760 mg.
3.2.	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg.
3.3.	$ZnCl_2$	1,635 mg.
3.4.	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg.
3.5.	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,714 mg.
3.6	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.
3.7.	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	3,630 mg.
3.8.	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg [dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat].
3.9.	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg (vt märkus 2).

Märkus 2: kasutatakse ainult ränivetikaliikide tüvikultuuride jaoks ette nähtud söötmetes.

4. pH reguleeritakse 0,1 N või 1,0 N NaOH või HCl lahusega väärtusele 7,5 ± 0,1.

5. Sööde filtritakse steriilsesse nõusse läbi membraanfiltri, mille poori läbimõõt on 0,22 μm (kui kasutatakse osakeste loendurit) või 0,45 μm (kui osakeste loendurit ei kasutata).

6. Söödet hoitakse kuni kasutamiseni valguse eest kaitstult 4 °C juures.

▼M6

4. liide

Vetikate kultiveerimise meetodi näide

Üldised märkused

Allpool kirjeldatud meetodit kasutatakse vetikate kultiveerimiseks mürgisuse määramise katsete jaoks.

Rakendatakse sobivaid meetmeid, et hoida ära vetikakultuuride nakatumine bakteritega. Tuleks eelistada puhaskultuuri; kasutatav vetikakultuur tuleb aga kindlasti saada ühestainsast organismist.

Teiste vetikate ja bakteritega saastumise ärahoidmiseks töötatakse steriilsetes tingimustes.

Seadmed ja materjalid

Vt jaotise „Katsemeetodi kirjeldus” alljaotist „Seadmed”.

Vetikakultuuride saamise meetodid

Toitelahuste (söötmete) valmistamine

Kõikidest söötmes kasutatavatest toitesooladest valmistatakse kontsentreeritud põhilahused, mida hoitakse jahedas ja valguse eest kaitstult. Need lahused steriliseeritakse filtrimise või autoklaavimise teel.

Söötme valmistamiseks lisatakse steriilsele destilleeritud veele vajalik kogus põhilahust, jälgides, et lahusesse ei satuks nakatumist põhjustavaid organisme. Tahke söötme saamiseks lisatakse 0,8 % agarit.

Tüvikultuur

Tüvikultuur on väikesemahuline vetikakultuur, mida kantakse korrapäraselt üle värskesse söötmesse ja kasutatakse katse algmaterjalina. Kui tüvikultuuri regulaarselt ei kasutata, külvatakse see viirgudena katseklaasidesse längagarile. Vähemalt kord kahe kuu jooksul kantakse kultuur üle uuele söötmele.

Tüvikultuuri kasvatatakse sobivat söödet sisaldavates koonilistes kolbides mahuga umbes 100 ml. Vetikate inkubeerimisel 20 °C juures pideva valgustuse tingimustes tuleb kultuur igal nädalal värskesse söötmesse üle kanda.

Selleks viiakse teatav kogus vana kultuuri steriilse pipetiga üle värske söötmega kolbi nii, et kiirelt kasvava liigi puhul oleks vetikate algsisaldus umbes 100 korda väiksem kui vanas kultuuris.

Asjaomase liigi kasvukiiruse võib määrata kasvukõvera alusel. Kui see on teada, on võimalik hinnata, millise tiheduse juures tuleks kultuur üle viia uude söötmesse. Kultuur tuleb üle kanda enne, kui see jõuab suremisfaasi.

Eelkultuur

Eelkultuur on ette nähtud sellise vetikakoguse saamiseks, mis on piisav katsenõude inokuleerimiseks. Eelkultuuri inkubeeritakse asjaomastes katsetingimustes ja kasutatakse siis, kui see on veel eksponentsiaalse kasvu faasis, tavaliselt pärast 2–4 päeva kestnud inkubeerimist. Kui vetikakultuur sisaldab moondunud või ebanormaalse väljanägemisega rakke, tuleb see kõrvaldada.

▼M6

5. liide

Mittelineaarsel regressioonil põhinev andmeanalüüs

Üldkaalutlused

Vetikate ja muude mikroorganismide kasvu katsetes on uuritav muutuja biomassi kasv, mis on oma olemuselt pidev mõõdetav muutuja ja mis väljendub protsessi kiiruses, kui vaadeldakse kasvukiirust, või selle ajaintegraalis, kui vaadeldakse saagist. Kumbagi uuritavat muutujat võrreldakse vastava muutuja keskmise väärtusega paralleelsetes uuritava kemikaalita kontrollkultuurides, kus asjaomane muutuja omandab kohaldatavates tingimustes – vetikakatse puhul on peamised kasvu mõjutavad tegurid valgus ja temperatuur – maksimaalse väärtuse. Tegemist on hajus- või homogeense süsteemiga, mille biomassi võib käsitada pideva suurusena, arvestamata iga üksikut rakku. Sellises süsteemis sõltub uuritava muutuja jaotuse hajuvus üksnes katsetingimustest (tavaliselt on vea jaotus lognormaalne või normaalne). See olukord on teistsugune kui tavapäraste binaarse muutujaga biokatsete puhul, kus hajuvuse peamise komponendina käsitatakse sageli iga üksiku organismi taluvust ja mille andmed on tavaliselt binoomjaotusega. Käesoleval juhul on null- ehk tausttase uuritava muutuja väärtus kontrollrühmas.

Lihtsal juhul kahaneb uuritava muutuja normaliseeritud ehk suhteline väärtus r monotoonselt, vähenedes väärtuselt 1 (pidurdumine puudub) väärtuseni 0 (täielik pidurdumine). Tuleb silmas pidada, et uuritava muutuja mõõtmine on alati seotud veaga ning arvutatud näiline negatiivne pidurdumine saab tuleneda üksnes juhuslikust veast.

Regressioonanalüüs

Mudelid

Regressioonanalüüsi eesmärk on kirjeldada kvantitatiivselt kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverat matemaatilise regressioonifunktsiooni $Y = f(C)$ kujul või sagedamini funktsioonina $Y = F(Z)$, kus $Z = \log C$. Pöördfunktsioon $C = f^{-1}(Y)$ võimaldab arvutada EC_x väärtused, sealhulgas EC_{50}, EC_{10} ja EC_{20}, ning nende usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Vetikate kasvu pidurdumise katsetes on kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kirjeldamisel edukalt kasutatud mitut lihtsat matemaatilist funktsiooni. Sellised funktsioonid on näiteks logistiline võrrand, mittesümmeetriline Weibulli võrrand ja lognormaalse jaotuse funktsioon, mis kõik kujutavad endast sigmoidkõveraid ning lähenevad asümptootiliselt nullile, kui $C \rightarrow 0$, ja ühele, kui $C \rightarrow \infty$.

Viimasel ajal on asümptootiliste mudelite alternatiivina välja pakutud pideva lävifunktsiooni mudelid (nt Kooijmani mudel populatsiooni kasvu pidurdumise kirjeldamiseks; Kooijman *et al*., 1996). Kooijmani mudeli puhul eeldatakse, et teatavast kontsentratsiooni läviväärtusest EC_0+ allpool uuritav mõju puudub; selle läviväärtuse leidmiseks ekstrapoleeritakse kontsentratsiooni ja mõju sõltuvuse kõverat kuni lõikumiseni kontsentratsiooniteljega, kasutades lihtsat pidevat funktsiooni, mis ei ole algpunktis diferentseeruv.

Analüüs võib seisneda lihtsalt hälvete ruutude summa minimeerimises (kui eeldatakse, et hajuvus on ühtlane) või kaalutud hälvete ruutude summa minimeerimises (hajuvuse heterogeensuse kompenseerimise puhul).

Analüüsi käik

Analüüsi käiku võib kirjeldada järgmiselt. Valitakse sobiv funktsioon $Y = f(C)$ ja lähendatakse see katseandmetele mittelineaarse regressiooni teel. Et saada katseandmete alusel võimalikult palju teavet, soovitatakse paralleelkultuuride keskmiste väärtuste asemel kasutada iga üksiku kolvi kohta saadud mõõteväärtusi. Praktilisest

▼M6

kogemusest nähtub siiski, et kui hajuvus on suur, võib paralleelkultuuride keskmise väärtuse kasutamisel saada usaldusväärsema, katseandmetes esinevatest süstemaatilistest vigadest vähem mõjutatud matemaatilise hinnangu kui iga üksiku andmepunkti kasutamisel.

Lähendatud kõver ja mõõteandmed kantakse graafikule ning kontrollitakse kõvera sobivust andmetega. Selleks võib olla eriti kasulik rakendada hälvete analüüsi. Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse väljendamiseks valitud funktsionaalne seos ei kirjelda hästi kogu kõverat või mõnda selle olulist osa, nt kemikaali mõju väikestel kontsentratsioonidel, valitakse lähendamiseks mõni muu kõver – näiteks võib sümmeetrilise kõvera asemel valida mittesümmeetrilise kõvera, mis vastab näiteks Weibulli funktsioonile. Kasvu negatiivne pidurdumine võib näiteks lognormaalse jaotuse funktsiooni korral probleeme tekitada ning ka sel juhul tuleb kasutada mõnda alternatiivset regressioonifunktsiooni. Sellistele negatiivsetele väärtustele ei soovitata omistada nullväärtust või väikest positiivset väärtust, kuna sellega moonutatakse vigade jaotust. Kõvera teatud lõikudes – näiteks kasvu vähese pidurdumise lõigus – võib olla vaja kasutada eraldi lähendust EC_x leidmiseks väikestel x väärtustel. Lähendatud võrrandi ja pöördfunktsiooni $C = f^{-1}(Y)$ abil arvutatakse mõju iseloomustavate punktide EC_x hinnangulised väärtused ning esitatakse vähemalt EC_{50} väärtus ja üks või kaks EC_x väärtust väikestel x väärtustel. Praktilistest katsetest saadud kogemusest nähtub, et vetikakatse puhul on tavaliselt võimalik hinnata piisava täpsusega kontsentratsiooni, mille juures kasv pidurdub 10 % võrra, kui andmepunkte on küllaldaselt ja väikestel kontsentratsioonidel ei täheldata segava tegurina stimuleerivat mõju. EC_{20} hinnanguline väärtus on sageli oluliselt täpsem kui EC_{10} väärtus, kuna EC_{20} asub tavaliselt kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera keskmises, ligikaudu lineaarses osas. Kasvule avalduva stimuleeriva mõju tõttu on EC_{10} väärtust mõnikord raske tõlgendada. Ehkki tavaliselt on EC_{10} piisava täpsusega määratav, soovitatakse seepärast alati esitada ka EC_{20}.

Kaalutegurid

Katsetulemuste hajuvus ei ole üldjuhul ühtlane ja hõlmab tavaliselt proportsionaalsuskomponenti; seepärast eelistatakse alati kasutada kaalutud regressiooni. Tavaliselt eeldatakse sellise analüüsi puhul, et kaalutegur on pöördvõrdeline hajuvusega:

$$W_i = 1/Var(r_i).$$

Paljud regressiooniprogrammid võimaldavad kasutada kaalutud regressiooni, millele vastavad kaalutegurid esitatakse tabelina. Kaalutegurid tuleks normaliseerida, korrutades need teguriga $n/\Sigma w_i$ (n on andmepunktide arv), nii et kõikide kaalutegurite summa on 1.

Uuritava muutuja normaliseerimine

Kontrollrühmas määratud muutuja keskväärtuse alusel normaliseerimine toob kaasa mõned põhimõttelised probleemid ja muudab hajuvuse struktuuri küllalt keeruliseks. Kui kasvu pidurdumise protsentuaalse määra leidmiseks jagatakse uuritava muutuja väärtus asjaomase muutuja keskväärtusega kontrollrühmas, tuuakse sisse kõnealuse keskväärtuse määramise veast tulenev lisaviga. Kui see viga ei ole tühiselt väike, tuleb regressiooni kaalutegureid ja usalduspiire korrigeerida, võttes arvesse kovariatsiooni kontrollväärtusega (Draper ja Smith, 1981). Tuleb silmas pidada, et kontrollrühma andmete keskväärtuse täpne määramine on oluline, sest selle kaudu minimeeritakse uuritava muutuja suhtelise väärtuse üldhajuvus. Seda hajuvust väljendatakse järgmiselt.

(Alaindeks i tähistab kontsentratsiooni i ja alaindeks 0 kontrollrühma.)

$$Y_i = \text{uuritava muutuja suhteline väärtus} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

ning hajuvus $Var(Y_i) = Var(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

ning kuna $(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0$ ja $(\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$

ning andmete normaaljaotuse ja paralleelkultuuride arvu m_i ja m_0 puhul $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$,

on uuritava muutuja suhtelise väärtuse Y_i üldhajuvus järgmine:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/(r_0^4 \cdot m_0).$$

Kontrollrühma andmete keskväärtuse viga on pöördvõrdeline kontrollkultuuride keskmistatud arvu ruutjuurega; seepärast võib vea oluliseks vähendamiseks mõnikord olla õigustatud varasemate andmete kaasamine analüüsi. Teine võimalus on loobuda andmete normaliseerimisest ja kasutada lähendamisel uuritava muutuja absoluutseid väärtusi, sealhulgas kontrollkultuuride andmeid, käsitledes kontrollrühmas leitud uuritava muutuja väärtust siiski mittelineaarse regressiooni teel lähendatava lisaparameetrina. Tavalise kaheparameetrilise regressioonivõrrandi puhul nõuab see meetod lähendamist kolme parameetri alusel ja sellest tulenevalt suuremat hulka andmepunkte võrreldes mittelineaarse regressiooniga, mis põhineb kontrollrühma kindlaksmääratud tulemuste alusel normaliseeritud andmetel.

Usaldusvahemike leidmine pöördhinnangu abil

Mittelineaarse regressiooni usaldusvahemike arvutamine pöördhinnangu abil on üsna keeruline ega kuulu tavaliste statistilise tarkvara pakettide standardsete võimaluste hulka. Ligikaudsed usalduspiirid võib arvutada standardsete mittelineaarset regressiooni võimaldavate programmide abil, kasutades ümberparametriseerimist (Bruce ja Versteeg, 1992), mille puhul matemaatiline võrrand kirjutatakse ümber nii, et hinnatavateks parameetriteks on soovitavad hinnangulised väärtused, nt EC_{10} ja EC_{50}. (Olgu funktsioon I = f (α, β, kontsentratsioon); kasutatakse määratlusest tulenevaid seoseid f (α, β, EC_{10}) = 0,1 ja f (α, β, EC_{50}) = 0,5, et asendada f (α, β, kontsentratsioon) samaväärse funktsiooniga g(EC_{10}, EC_{50}, kontsentratsioon).)

Otsesema arvutusmeetodi kasutamisel (Andersen *et al*., 1998) jäetakse võrrand originaalkujule ja arendatakse funktsioon Taylori ritta r_i ja r_0 keskväärtuste ümbruses.

Viimasel ajal on muutunud populaarseks andmete usaldusväärsuse iteratiivsel kontrollimisel põhinevad meetodid (*bootstrap*-meetodid). Nende meetodite puhul kasutatakse hajuvuse empiirilise jaotuse hindamiseks katseandmeid ja sagedast korduvat valimi moodustamist juhuslike arvude generaatori abil.

KIRJANDUS

Kooijman, S. A. L. M., Hanstveit, A. O., ja Nyholm, N. (1996). No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Res*. 30: 1625–1632.

Draper, N. R., ja Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, teine väljaanne. Wiley, New York.

Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485–1494.

Andersen, J. S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A., ja Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *J. Agr. Biol. Envir. St*. 3: 405–420.C.

▼B

C.4. KOHESE BIOLAGUNDUVUSE MÄÄRAMINE

I OSA ÜLDPÕHIMÕTTED

I.1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatakse kuut katsemeetodit, mis sobivad kemikaalide kohese biolagunduvuse sõelkatseteks aeroobses veekeskkonnas:

a) lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) kõrvaldamine (meetod C.4-A);

b) muudetud OECD sõelkatse – DOC kõrvaldamine (meetod C.4-B);

c) süsinikdioksiidi (CO_2) eraldumine (muudetud Sturmi katse) (meetod C.4-C);

d) manomeetriline respiromeetria (meetod C.4-D);

e) kinnise pudeli katse (meetod C.4-E);

f) MITI (Jaapani Väliskaubandus- ja Tööstusministeeriumi) katse (meetod C.4-F).

Kõigi kuue katse üldpõhimõtted on esitatud meetodi I osas. Üksikute meetodite spetsiifilised osad on esitatud II–VII osas. Lisades on toodud määratlused, valemid ja suunismaterjalid.

1988. a tehtud OECD laboritevaheline võrdluskatse näitas, et nende meetoditega saadakse ühtseid tulemusi. Siiski võib mõni meetod olenevalt aine füüsikalistest omadustest olla eelistatav.

I.2. SOBIVA MEETODI VALIMINE

Sobivaima meetodi valikul on olulised andmed kemikaali lahustuvuse, aururõhu ja adsorptsiooniomaduste kohta. Teoreetiliste väärtuste arvutamisel ja/või mõõdetud väärtuste, nt ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (vt 1. ja 2. liide) kontrollimisel on vaja teada aine keemilist struktuuri või valemit.

Aineid, mille lahustuvus vees on vähemalt 100 mg/ml, võib analüüsida kõigi meetoditega eeldusel, et ained ei ole lenduvad ega adsorbeeruvad. Tabelis 1 on märgitud meetodid, mis sobivad vees vähelahustuvate, lenduvate või adsorbeeruvate kemikaalide puhul. Vees vähelahustuvate ja lenduvate kemikaalide käsitlemisviise on kirjeldatud 3. liites. Mõõdukalt lenduvaid kemikaale võib uurida DOC kõrvaldamise katses eeldusel, et katseanumates (mis peaksid olema sobival moel suletud) on küllaldaselt vaba ruumi gaasifaasile. Sellisel juhul tuleb füüsikaliste kadude arvessevõtmiseks teha ka abiootiline kontrollkatse.

▼B

Tabel 1

Katsemeetodite kohaldatavus

Katse	Analüüsimeetod	Sobivus ainetele, mis on:		
		vähelahustuvad	lenduvad	adsorbeeruvad
DOC kõrvaldamine	Lahustunud orgaaniline süsinik	—	—	+/-
Muudetud OECD sõelkatse	Lahustunud orgaaniline süsinik	—	—	+/-
CO_2 eraldumine	Respiromeetria: CO_2 eraldumine	+	—	+
Manomeetriline respiromeetria	Manomeetriline respiromeetria: hapniku tarbimine	+	+/-	+
Kinnise pudeli katse	Respiromeetria: lahustunud hapnik	+/-	+	+
MITI katse	Respiromeetria: hapniku tarbimine	+	+/-	+

Saadud tulemuste tõlgendamisel on vaja andmeid katsematerjali puhtusastme või põhikomponentide osakaalu kohta, eriti kui tulemused on väikesed või piiripealsed.

Andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta bakteritele (IV liide) võivad olla sobivate katsekontsentratsioonide valikul väga kasulikud ja madalate biolagunduvuse väärtuste õigel tõlgendamisel hädavajalikud.

I.3. VÕRDLUSAINED

Töövõtete kontrollimiseks tehakse koos tavaliste katsetega sobivas kolvis paralleelkatse kohese biolagunduvuse kriteeriumidele vastavate võrdlusainetega.

Sobivad võrdlusained on aniliin (värskelt destilleeritud), naatriumatsetaat ja naatriumbensoaat. Võrdlusained lagunevad nende meetodite puhul isegi ilma otseselt inokulaati lisamata.

On tehtud ettepanekuid bioloogiliselt kergesti laguneva, kuid inokulaadi lisamist nõudva võrdlusaine otsimiseks. Välja on pakutud kaaliumvesinikftalaati, kuid enne selle aine võrdlusainena tunnustamist tuleb selle kohta rohkem andmeid koguda.

Respiromeetrilistes katsetes võivad lämmastikku sisaldavad ühendid nitrifikatsiooni kaudu mõjutada hapniku tarbimist (vt II ja V liidet).

I.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE

Testaine lahus või suspensioon mineraalses toitelahuses inokuleeritakse ja seda inkubeeritakse aeroobsetes tingimustes pimedas või hajutatud valguse käes. Inokulaadist pärit DOC kogus katselahuses tuleks testainest pärit DOC kogusega võrreldes hoida võimalikult madal. Et arvestada endogeenset aktiivsust inokulaadis, tehakse paralleelne pimekatse inokulaadiga ja ilma testaineta, ehkki endogeenne aktiivsus rakkudes testaine juuresolekul ei ole täpselt identne endogeense kontrollproovi omaga. Töövõtete toimimise kontrolliks tehakse paralleelkatse võrdlusainega.

▼B

Üldjuhul jälgitakse lagundamisprotsessi mitmesuguste parameetrite, nagu DOC, CO_2 eraldumise ja hapniku tarbimise põhjal ja mõõtmisi tehakse nii sageli, et see võimaldab määrata biolagundamise algust ja lõppu. Automaatsete respiromeetrite kasutamisel toimub mõõtmine pidevalt. Lisaks mingile muule parameetrile mõõdetakse vahel DOC-d, kuid tavaliselt tehakse seda ainult katse alguses ja lõpus. Kasutada võib ka spetsiifilist keemilist analüüsi testaine esmase lagunemise ja mis tahes tekkinud vaheühendite kontsentratsiooni määramiseks (nõutav MITI katses).

Üldjuhul on katse pikkus 28 päeva. Katsed võib siiski lõpetada enne 28 päeva möödumist, st kohe, kui biolagundamise graafik on jõudnud platooni ja jäänud sinna vähemalt kolmeks mõõtmiseks. Katseid võib pikendada ka pikemaks kui 28 päeva, kui graafik näitab, et biolagundumine on alanud, kuid platooni ei ole 28 päeva jooksul jõutud.

I.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

I.5.1. **Reprodutseeritavus**

Biodegradatsiooni ja inokulaadina kasutatud bakteripopulatsioonide iseloomu tõttu tuleks kõiki määramisi teha vähemalt kahe paralleelina.

Kogemus näitab, et mida suurem on katsekeskkonda lisatud mikroorganismide kontsentratsioon, seda väiksemad on korduskatsete vahelised erinevused. Laboritevahelised võrdlused on näidanud ka seda, et eri laborites saadud tulemused võivad erineda üsna palju, kuid tavaliselt saadakse hea biolagunduvusega ühendite puhul üsna sarnased tulemused.

I.5.2. **Katse kehtivus**

Katse loetakse kehtivaks, kui uuritava kemikaali kõrvaldamisparameetri kordusväärtuste suurim erinevus platool ja katse lõpus või kümnepäevase akna lõpus on väiksem kui 20 % ja kui võrdlusaine protsentuaalne lagunemine on 14 päeva jooksul jõudnud kohese biolagunduvuse määrani. Kui kas või üks neist tingimustest ei ole täidetud, tuleb katset korrata. Meetodite piiratuse tõttu ei tähenda madalad väärtused tingimata seda, et testaine keskkonnas bioloogiliselt ei lagune, küll aga seda, et biolagunduvuse määramine nõuab rohkem tööd.

Kui lagunemise määr on testaine ja võrdlusainega mürgisuse katses 14 päeva jooksul alla 35 % (DOC järgi) või alla 25 % (ThOD või $ThCO_2$ järgi), võib testaine lugeda bioloogilisi protsesse pidurdavaks (vt ka IV liidet). Katseseeriat tuleks korrata, võimaluse korral uuritava kemikaali madalama kontsentratsiooni ja/või inokulaadi kõrgema kontsentratsiooniga, kuid mitte rohkem kui 30 mg tahkeid aineid/liitris.

I.6. ÜLDISED TÖÖMEETODID JA ETTEVALMISTUSED

Katsete puhul kehtivad üldnõuded on kokku võetud tabelis 2. Konkreetselt üksikute katsetega seotud seadmeid ja katsetingimusi kirjeldatakse hiljem, vastava katse alapunktis.

▼B

Tabel 2

Katsetingimused

Katse	DOC kõrvaldamine	CO_2 eraldumine	Manomeetriline respiromeetria	Muudetud OECD sõelkatse	Kinnise pudeli katse	MITI (I)
Testaine kontsentratsioon						
mg/l			100		2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20	10–40	10–40		
mg ThOD/l			50–100		5–10	
Inokulaadi kontsentratsioon (rakkudes/l, ligikaudne)	≤ 30 mg/l hõljumit või ≤ 100 ml reovett/l (10^7–10^8)			0,5 ml töödeldud reovett/l (10^5)	≤ 5 ml reovett/l (10^4–10^6)	30 mg/l hõljumit (10^7–10^8)
Elementide kontsentratsioonid mineraalses toitelahuses (mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05—0,1				0,05—0,1	0,15
pH	7,4± 0,2					eelistatavalt 7,0
Temperatuur	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = lahustunud orgaaniline süsinik ThOD = lahustunud orgaaniline süsinik SS = hõljuvaine

I.6.1. **Lahjendusvesi**

Kasutatakse deioniseeritud või destilleeritud vett, mis ei sisalda inhibeerivates kontsentratsioonides mürgiseid aineid (nt Cu^{++} ioone). Orgaanilise süsiniku sisaldus ei tohi olla suurem kui 10 % testainest tulenevast orgaanilise süsiniku sisaldusest. Vee kõrge puhtusaste aitab välistada kõrgete tulemuste saamise nullproovidega. Saastus võib tuleneda nii testaines olevatest lisanditest kui ka ioonvahetusvaikudest ja lüüsunud bakteri- või vetikamaterjalist. Igas katseseerias tuleb kasutada ainult samast partiist pärit vett, millele on eelnevalt tehtud DOC analüüs. Kinnise pudeli katses selline analüüs vajalik ei ole, kuid vee hapnikutarve peab olema madal.

▼B

I.6.2. **Mineraalainete põhilahused**

Katselahuste jaoks valmistatakse sobivate mineraalainete kontsentratsioonidega põhilahused. Järgmised põhilahused sobivad (erinevaid lahjendusastmeid kasutades) DOC kõrvaldamise katse, muudetud OECD sõelkatse, CO_2 eraldumise katse, manomeetrilise respiromeetria katse ja kinnise pudeli katse jaoks.

Lahjendusastmed ja MITI katse mineraalse toitelahuse valmistamisjuhend on esitatud vastavate katsete alapunktides.

Põhilahused

Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.

a)	Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaaliumvesinikfosfaat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinaatriumvesinikfosfaatdihüdraat, Na_2HPO_4, $2H_2O$	33,40 g
	Ammooniumkloriid, NH_4Cl	0,50 g
	Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini. Lahuse pH peaks olema 7,4.	
b)	Kaltsiumkloriid, veevaba, $CaCl_2$	27,50 g
	või kaltsiumkloriiddihüdraat, $CaCl_2 \times 2\ H_2O$	36,40 g
	Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini	
c)	Magneesiumsulfaatheptahüdraat, $MgSO_4 \times 7\ H_2O$	22,50 g
	Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini	
d)	Raud(III)kloriidheksahüdraat, $FeCl_3 \times 6\ H_2O$	0,25 g
	Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.	

Märkus. Vältimaks vajadust valmistada lahus vahetult enne kasutamist, tuleb neile 1 liitri kohta lisada üks tilk konts. vesinikkloriidhapet või 0,4 g etüleendiamiintetraäädikhappe dinaatriumsoola.

I.6.3. **Kemikaalide põhilahused**

Juhul kui aine lahustuvus ületab 1 g/l, lahustada vastavalt vajadusele 1–10 g test- või võrdlusainet deioniseeritud vees ja täiendada veega 1 liitrini. Teise võimalusena võib valmistada põhilahuse mineraalses toitelahuses või lisada kemikaali otse mineraalsele toitelahusele. Halvemini lahustuvate kemikaalide käsitlemist vt 3. liitest, kuid MITI katses (meetod C.4-F) ei tohi kasutada ei lahusteid ega emulgaatoreid.

▼B

1.6.4. **Inokulaadid**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, (klooritamata) reovett, pinnavett või mulda või nende segu. DOC kõrvaldamise, CO_2 eraldumise või manomeetrilise respiromeetria katses aktiivmuda kasutamisel peaks see olema pärit valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest. Teistest allikatest pärit inokulaatide puhul on ilmnenud tulemuste suurem hajuvus. Muudetud OECD sõelkatse ja kinnise pudeli katse jaoks on vaja lahjemat, mudahelvesteta inokulaati, eelistatav allikas on valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuv töödeldud reovesi. MITI katse inokulaat valmistatakse mitmete lähtematerjalide segust ja vastav kirjeldus on esitatud konkreetse katse alapunktis.

I.6.4.1. *Aktiivmudast saadud inokulaat*

Proov võetakse valdavalt olmereovett töötleva puhastusjaama või laborimõõdus seadme aeratsioonibasseini värskest aktiivmudast. Vajaduse korral eemaldatakse peene sõelaga filtrimisel jämedad osakesed ja hoitakse muda seejärel aeroobsena.

Teine võimalus on muda pärast jämedate osakeste eemaldamist setitada või tsentrifuugida (näiteks 1 100 g 10 min). Kõrvaldatakse supernatant. Muda võib pesta mineraalse toitelahusega. Kontsentreeritud muda suspendeeritakse mineraalses toitelahuses kontsentratsioonil 3–5 g hõljumit/l ja aereeritakse tarvitamiseni.

Muda tuleks võtta tavapärasest, töökorras puhastusjaamast. Suure koormusega puhastusjaamast pärinevat või inhibiitoreid sisaldada võivat muda tuleks pesta. Pärast põhjalikku segamist resuspendeeritud muda setitatakse või tsentrifuugitakse, kõrvaldatakse supernatant ja resuspendeeritakse muda järgmises koguses mineraalses toitelahuses. Protseduuri korratakse, kuni muda loetakse substraadi liiast või inhibiitorist vabaks.

Täielikult resuspendeeritud või töötlemata mudast võetakse vahetult enne kasutamist proov hõljumi kuivmassi määramiseks.

Veel üks võimalus on aktiivmuda homogeniseerida (3–5 g hõljumit/l). Muda töödeldakse keskmisel kiirusel 2 min mehaanilises segistis. Homogeniseeritud muda setitatakse 30 min või vajaduse korral kauem ja dekanteeritakse vedelik, mida kasutatakse inokulaadina kontsentratsioonil 10 ml/l mineraalse toitelahuse kohta.

I.6.4.2. *Muud inokulaadiallikad*

Inokulaadi võib valmistada valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Selleks võetakse värske proov, mida hoitakse transportimisel aeroobsena. Mudal lastakse 1 h seista või filtritakse see läbi jämeda filterpaberi ja hoitakse dekanteeritud vedelik või filtraat kuni tarvitamiseni aeroobsena. Sellist inokulaati võib kasutada kuni 100 ml toitelahuse liitri kohta.

▼B

Veel üks võimalik inokulaadiallikas on pinnavesi. Sobivast pinnaveekogust, nt jõest või järvest võetakse proov ja hoitakse seda tarvitamiseni aeroobsena. Vajaduse korral kontsentreeritakse inokulaati filtrimise või tsentrifuugimise teel.

I.6.5. **Inokulaatide kohandamine**

Inokulaate võib lasta kohanduda katsetingimustega, kuid mitte adapteeruda uuritava kemikaaliga. Kohandamine seisneb aktiivmuda aeratsioonis mineraalses toitelahuses või töödeldud reovees katsetemperatuuril 5–7 päeva jooksul. Mõnikord parandab kohandamine katsemeetodite täpsust, vähendades nullproovidega saadavaid tulemusi. MITI inokulaadi kohandamist ei peeta vajalikuks.

I.6.6. **Abiootilised kontrollproovid**

Vajaduse korral kontrollitakse testaine võimalikku abiootilist lagunemist, uurides DOC kõrvaldamist, hapniku tarbimist või süsinikdioksiidi eraldumist steriilsetes inokulaadita kontrollproovides. Proov steriliseeritakse filtrimisel läbi membraani (0,2–0,45 μm) või sobiva mürkaine lisamisel vajalikus kontsentratsioonis. Membraanfiltratsiooni kasutamisel võetakse proovid steriilsuse tagamiseks aseptiliselt. Kui uuritava kemikaali adsorbeerumine ei ole eelnevalt välistatud, tuleb katsetes, kus biolagundumist mõõdetakse DOC kõrvaldamise järgi, eriti aktiivmuda-inokulaatide kasutamisel, kasutada inokuleeritavat ja mürgitatavat abiootilist kontrollproovi.

I.6.7. **Kolbide arv**

Kolbide arv tüüpilises katses on ära toodud iga katse alapunktis.

Kasutada võib järgmisi kombinatsioone:

— katsesuspensioon: sisaldab testainet ja inokulaati;

— inokulaadi nullproov: sisaldab ainult inokulaati;

— protseduuri kontrollproov: sisaldab võrdlusainet ja inokulaati;

— abiootiline steriilne kontrollproov: steriilne, sisaldab testainet (vt I.6.6);

— adsorptsiooni kontrollproov: sisaldab testainet, inokulaati ja steriliseerivat ainet;

— mürgisuse kontrollproov: sisaldab testainet, võrdlusainet ja inokulaati.

Paralleelmõõtmised katsesuspensiooni ja inokulaadi nullprooviga on kohustuslikud. Soovitatav on teha mõõtmised ka ülejäänud paralleelidega.

See ei pruugi aga alati võimalik olla. Tagada tuleb küllaldane proovide või mõõtmiste arv protsentuaalse kõrvaldamise leidmiseks 10-päevase akna kestel.

▼B

I.7. ANDMED JA HINDAMINE

Protsentuaalse lagunemise (D_t) arvutamisel kasutatakse nii katseanuma kui ka inokulaadi nullproovi kordusmõõtmiste keskmisi. Vastavad valemid on sätestatud allpool, konkreetsetele katsetele vastavates alapunktides. Lagunemise käik esitatakse graafiliselt ja näidatakse ära kümnepäevane aken. Tuleks arvutada ja esitada kõrvaldamisprotsent kümnepäevase akna lõpus ja väärtus platool või katse lõpus, vastavalt vajadusele.

Respiromeetrilistes katsetes võivad lämmastikku sisaldavad ühendid nitrifikatsiooni kaudu mõjutada hapniku tarbimist (vt II ja V liidet).

I.7.1. **DOC määramise põhjal mõõdetud lagunemine**

Katse kehtivuse hindamiseks tuleks testainet sisaldavate kolbide kohta eraldi arvutada protsentuaalne lagunemine (D_t) igal proovi võtmise hetkel, kasutades DOC topeltmõõtmiste keskmisi väärtusi (vt I.5.2). See arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

kus:

D_t = lagunemisprotsent ajahetkel t,

C_o = DOC keskmine algkontsentratsioon testainet sisaldavas inokuleeritud toitelahuses (mg DOC/l),

C_t = DOC keskmine kontsentratsioon testainet sisaldavas inokuleeritud toitelahuses ajahetkel t (mg DOC/l),

C_{bo} = DOC keskmine algkontsentratsioon substraadivabas inokuleeritud mineraalses toitelahuses (mg DOC/l),

C_{bt} = DOC keskmine kontsentratsioon substraadivabas inokuleeritud mineraalses toitelahuses ajahetkel t (mg DOC/l).

Kõik kontsentratsioonid määratakse katseliselt.

I.7.2. **Spetsiifilise analüüsi põhjal mõõdetud lagunemine**

Kui on olemas spetsiifilise analüüsi andmed, arvutatakse esmane biolagunemine valemist:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kus:

D_t = lagunemisprotsent ajahetkel t, üldjuhul 28 päeva möödumisel,

S_a = testaine jääk inokuleeritud toitelahuses katse lõpul (mg),

S_b = testaine jääk pimekatses vee/toitelahusega, kuhu on lisatud ainult testaine (mg).

▼B

1.7.3. **Abiootiline lagunemine**

Abiootilise steriilse kontrollproovi kasutamisel arvutatakse protsentuaalne abiootiline lagunemine valemist:

$$\text{protsentuaalne abiootiline lagunemine} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kus

$C_{s(o)}$ = DOC kontsentratsioon steriilses kontrollproovis 0-päeval,

$C_{s(t)}$ = DOC kontsentratsioon steriilses kontrollproovis päeval t.

I.8. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— test- ja võrdlusaineid ning nende puhtusastet;

— katsetingimusi;

— inokulaadi kohta: tüüpi ja päritolu, kontsentratsiooni ja kohandamist, kui seda kasutati;

— tööstuslike heitmete osakaalu ja iseloomu reovees, kui see on teada;

— katse kestust ja temperatuuri;

— vähelahustuvate testainete puhul nende käsitlemismeetodeid;

— kasutatud katsemeetodit; meetodi mis tahes muudatusi tuleb teaduslikult põhjendada ja seletada;

— andmeid;

— kõiki täheldatud inhibitsiooninähte;

— abiootilist lagunemist, kui seda täheldati;

— spetsiifilise keemilise analüüsi andmeid, kui neid on;

— vaheühendite analüüsiandmeid, kui neid analüüsiti;

— test- ja võrdlusainete protsentuaalse lagunemise graafikut ajas; selgelt tuleks näidata ootefaas, lagunemisfaas, kümnepäevane aken ja tõus (1. liide). Kui katse vastab kvaliteedinõuetele, võib graafikul kasutada testainet sisaldavate kolbide lagunemisprotsentide keskmist väärtust;

— lagunemisprotsenti kümnepäevase akna lõpus ja platool või katse lõpus.

II OSA **DOC KÕRVALDAMISE KATSE** (meetod C.4-A)

II.1. PÕHIMÕTE

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–40 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, aereeritakse pimedas või hajutatud valguse käes 22 ± 2 °C juures.

▼B

Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul sagedaste DOC analüüsidega. Arvutatakse biolagundumise määr, väljendades kõrvaldatud DOC kontsentratsiooni (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) protsendina algkontsentratsioonist. Esmase biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal.

II.2. MEETODI KIRJELDUS

II.2.1. **Seade**

a) koonilised kolvid, mahuga nt 250 ml kuni 2 l, olenevalt DOC analüüsiks vajalikust mahust;

b) kooniliste kolbide loksutusseade, mis on termostateeritud või asub püsiva temperatuuriga ruumis ja on piisava võimsusega aeroobsete tingimuste tagamiseks kõigis kolbides;

c) sobivate membraanidega filtrimisseade;

d) DOC analüsaator;

e) lahustunud hapniku määramise seade;

f) tsentrifuug.

II.2.2. **Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahjendusveega, liidetakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitrini.

II.2.3. **Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda; reovett; pinnavett või mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

II.2.4. **Kolbide ettevalmistamine**

Näiteks viiakse 800 ml kogused mineraalset toitelahust 2 l koonilistesse kolbidesse ning lisatakse eri kolbidesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid, nii et saadakse kemikaalikontsentratsioon, mis vastab 10–40 mg DOC-ile liitris. Kontrollitakse pH väärtusi ja viiakse need vajaduse korral 7,4ni. Kolvid inokuleeritakse aktiivmuda või muud päritolu inokulaadiga (vt I.6.4), lõpliku hõljumi kontsentratsiooniga kuni 30 mg/l. Valmistatakse ka inokulaadi kontrollproovid mineraalse toitelahusega, kuid ilma test- või võrdlusaineta.

Vajaduse korral kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, inokuleerides võrreldavate kontsentratsioonidega test- ja võrdlusaine lahuse mineraalses toitelahuses.

Vajaduse korral kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6).

▼B

Kui arvatakse, et testaine võib olulisel määral adsorbeeruda klaasil, mudal jne, tehakse eelkatse, kus hinnatakse adsorptsiooni tõenäolist ulatust ja seega ka katse sobivust antud ainele (vt tabelit 1). Selleks valmistatakse ette kolb testaine, inokulaadi ja steriliseeriva ainega.

Lahused kõigis kolbides täiendatakse mineraalse toitelahusega 1 liitrini ja võetakse pärast segamist igast kolvist DOC algkontsentratsiooni määramiseks proov (vt II.4 liide). Kolbide avad kaetakse nt alumiiniumfooliumiga nii, et see ei takista õhu vaba liikumist kolvi ja ümbritseva atmosfääri vahel. Seejärel asetatakse kolvid katse alustamiseks loksutisse.

II.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral:

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov,

kolb 7: adsorptsiooni kontrollproov,

kolb 8: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

II.2.6. **Katse tegemine**

Kogu katse kestel määratakse igas kolvis kindlate ajavahemike järel DOC kontsentratsioon, piisava sagedusega kümnepäevase akna alguse määramiseks ja protsentuaalse kõrvaldamise määramiseks kümnepäevase akna lõpus. Igaks määramiseks võetakse ainult minimaalne vajalik kogus katsesuspensiooni.

Enne proovide võtmist korvatakse vajaduse korral aurustumiskaod kolbides vajaliku koguse lahjendusvee lisamisega (I.6.1). Segu segatakse enne proovi võtmist hoolikalt ja veendutakse, et nõu seintele sadestunud materjal enne proovi võtmist lahustub või suspendeerub. Kohe pärast võtmist proovid membraan-filtreeritakse või tsentrifuugitakse (vt II.4 liidet). Filtritud või tsentrifuugitud proovid analüüsitakse samal päeval või säilitatakse 2–4 °C juures kuni 48 tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

II.3. ANDMED JA ARUANDLUS

II.3.1. **Tulemuste käsitlemine**

Protsentuaalne lagunemine ajahetkel t arvutatakse punktis I.7.1 (DOC määramine) ja vajaduse korral ka punktis 1.7.2 (spetsiifiline analüüs) kirjeldatud moel.

Kõik tulemused esitatakse etteantud andmetabelis.

▼B

II.3.2. **Tulemuste kehtivus**

Vt punkti I.5.2.

II.3.3. **Aruandlus**

Vt punkti I.8.

II.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

DOC KÕRVALDAMISE KATSE

1. **LABOR**

2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**

3. **TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: … (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses, t_0: … (kemikaali sisaldus, mg/l)

4. **INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: … mg/l

5. **SÜSINIKU MÄÄRAMINE**

Süsinikuanalüsaator:

	Kolvi nr		DOC n päeva pärast (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testaine koos inokulaadiga	1	a_1					
		a_2					
		a, keskmine $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, keskmine $C_{b(t)}$					

▼B

	Kolvi nr		DOC n päeva pärast (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Inokulaadi null-proovid testaineta	3	C_1					
		C_2					
		c, keskmine $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, keskmine $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE**

Kolvi nr		Lagunemisprotsent in päeva möödumisel				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Keskmine (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 ja D_2 ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

Märkus. Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

7. **ABIOOTILINE KONTROLLPROOV** (pole kohustuslik)

	Aeg (päevades)	
	0	t
DOC konts. steriilses kontrollproovis (mg/l)	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{protsentuaalne abiootiline lagunemine} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPETSIIFILINE KEEMILINE ANALÜÜS** (pole kohustuslik)

	Testaine jääk katse lõpus (mg/l)	Esmase lagunemise %
Steriilne kontrollproov	S_b	

▼B

	Testaine jääk katse lõpus (mg/l)	Esmase lagunemise %
Inokuleeritud toitelahus	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III OSA **MUUDETUD OECD SÕELKATSE** (meetod C.4-B)

III.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–40 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, inokuleeritakse 0,5 ml reoveega liitri lahuse kohta. Seejärel aereeritakse segu pimedas või hajutatud valguse käes 22 ± 2 °C juures.

Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul sagedaste DOC analüüsidega. Arvutatakse biolagundumise määr, väljendades kõrvaldatud DOC kontsentratsiooni (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) protsendina algkontsentratsioonist. Esmase biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul ja lõpul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal.

III.2. MEETODI KIRJELDUS

III.2.1. Seadmed:

a) koonilised kolvid, mahuga nt 250 ml kuni 2 l, olenevalt DOC analüüsiks vajalikust mahust;

b) kooniliste kolbide loksutusseade, mis on termostateeritud või asub püsiva temperatuuriga ruumis ja on piisava võimsusega aeroobsete tingimuste tagamiseks kõigis kolbides;

c) sobivate membraanidega filtrimisseade;

d) DOC analüsaator;

e) lahustunud hapniku määramise seade;

f) tsentrifuug.

III.2.2. **Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 80 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b–d ja täiendatakse veega 1 liitrini.

Selles meetodis kasutatakse ainult 0,5 ml inokulaati liitri kohta, mistõttu võib olla vaja lisada toitelahusele mikroelemente ja kasvutegureid. Selleks lisatakse liitri lõpliku toitelahuse kohta 1 ml igast järgmisest lahusest:

▼B

Mikroelementide lahus:

Mangaansulfaattetrahüdraat, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Boorhape, H_3BO_3	57,2 mg
Tsinksulfaatheptahüdraat, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Ammooniumheptamolübdaat, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe-kelaat ($FeCl_3$-etüleendiamiintetraäädikhape)	100,0 mg

Lahustatakse vees ja täiendatakse lahjendusveega 1 000 ml-ni.

Vitamiinilahus:

pärmiekstrakt	15,0 mg

Pärmiekstrakt lahustatakse 100 ml vees. Lahus steriliseeritakse filtrimisel läbi 0,2 μm membraani või valmistatakse vahetult enne kasutamist.

III.2.3. **Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi võib valmistada valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Vt punkte I.6.4.2 ja I.6.5.

Kasutatav kogus on 0,5 ml ühe liitri mineraalse toitelahuse kohta.

III.2.4. **Kolbide ettevalmistamine**

Näiteks viiakse 800 ml kogused mineraalset toitelahust 2 l koonilistesse kolbidesse ning lisatakse eri kolbidesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid, nii et saadakse kemikaalikontsentratsioon, mis vastab 10–40 mg DOC-ile liitris. Kontrollitakse pH väärtust ja viiakse see vajaduse korral 7,4ni. Kolvid inokuleeritakse 0,5 ml reovee lisamisega liitri kohta (vt I.6.4.2). Valmistatakse ka inokulaadi kontrollproovid mineraalse toitelahusega, kuid ilma test- või võrdlusaineta.

Vajaduse korral kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, inokuleerides võrreldavate kontsentratsioonidega test- ja võrdlusaine lahuse mineraalses toitelahuses.

Vajaduse korral kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6).

Kui arvatakse, et testaine võib olulisel määral adsorbeeruda klaasil, mudal jne, tehakse eelkatse, kus hinnatakse adsorptsiooni tõenäolist ulatust ja seega ka katse sobivust antud ainele (vt tabelit 1). Selleks valmistatakse ette kolb testaine, inokulaadi ja steriliseeriva ainega.

Lahused kõigis kolbides täiendatakse mineraalse toitelahusega 1 liitrini ja võetakse pärast segamist igast kolvist DOC algkontsentratsiooni määramiseks proov (vt II.4 liidet). Kolbide avad kaetakse näiteks alumiiniumfooliumiga nii, et see ei takista õhu vaba liikumist kolvi ja ümbritseva atmosfääri vahel. Seejärel asetatakse kolvid katse alustamiseks loksutisse.

▼B

III.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov,

kolb 7: adsorptsiooni kontrollproov,

kolb 8: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

III.2.6. **Katse tegemine**

Kogu katse kestel määratakse igas kolvis kindlate ajavahemike järel DOC kontsentratsioon piisava sagedusega kümnepäevase akna alguse määramiseks ja protsentuaalse kõrvaldamise määramiseks kümnepäevase akna lõpus. Igaks määramiseks võetakse ainult minimaalne vajalik kogus katsesuspensiooni.

Enne proovide võtmist korvatakse vajaduse korral aurustumiskaod kolbides vajaliku koguse lahjendusvee lisamisega (I.6.1). Segu segatakse enne proovi võtmist hoolikalt ja veendutakse, et nõu seintele sadestunud materjal enne proovi võtmist lahustub või suspendeerub. Kohe pärast võtmist proovid membraan-filtreeritakse või tsentrifuugitakse (vt II.4 liidet). Filtritud või tsentrifuugitud proovid analüüsitakse samal päeval või säilitatakse 2–4 °C juures kuni 48 tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

III.3. ANDMED JA ARUANDLUS

III.3.1. **Tulemuste käsitlemine**

Protsentuaalne lagunemine ajahetkel t arvutatakse punktis I.7.1 (DOC määramine) ja vajaduse korral ka punktis I.7.2 (spetsiifiline analüüs) kirjeldatud moel.

Kõik tulemused esitatakse etteantud andmetabelis.

III.3.2. Tulemuste kehtivus

Vt punkti I.5.2.

III.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

III.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

MUUDETUD OECD SÕELKATSE

1. **LABOR**

2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**

▼B

3. **TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: … (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses, t_0: … (kemikaali sisaldus, mg/l)

4. **INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: … mg/l

5. SÜSINIKU MÄÄRAMINE

Süsinikuanalüsaator:

	Kolvi nr		DOC n päeva möödumisel (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testaine koos inokulaadiga	1	a_1					
		a_2					
		a, keskmine $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, keskmine $C_{b(t)}$					
Inokulaadi null-proovid testaineta	3	C_1					
		C_2					
		c, keskmine $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, keskmine $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE**

Kolvi nr		Laguremisprotsent n päeva pärast				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Kolvi nr		Laguremisprotsent n päeva pärast				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Keskmine (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 ja D_2 ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

Märkus. Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

7. **ABIOOTILINE KONTROLLPROOV** (pole kohustuslik)

	Aeg (päevades)	
	0	t
DOC konts. steriilses kontrollproovis (mg/l)	$C_{S(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{Protsentuaalne abiootiline lagunemine} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPETSIIFILINE KEEMILINE ANALÜÜS** (pole kohustuslik)

	Testaine jääk katse lõpus	Esmase lagunemise %
Steriilne kontrollproov	S_b	
Inokuleeritud toitelahus	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV OSA CO_2 ERALDUMISE KATSE (meetod C.4-C)

IV.1. PÕHIMÕTE

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–20 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, aereeritakse süsinikdioksiidivaba õhu läbipuhumisega kindlal kiirusel pimedas või hajutatud valguse käes. Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul eralduva CO_2 määramise abil, viimane püütakse baarium- või naatriumhüdroksiidi ja mõõdetakse hüdroksiidi jäägi tiitrimise või anorgaanilise süsiniku määramise teel. Testainest tekkiv süsinikdioksiidi kogus (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina $ThCO_2$-st. Biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul tehtud täiendava DOC analüüsi põhjal.

▼B

IV.2. KATSEMEETODI KIRJELDUS

IV.2.1. **Seadmed**

a) 2–5liitrised kolvid peaaegu põhjani ulatuva aeratsioonitoru ja väljaviiguga;

b) vähelahustuvate ainete uurimisel magnetsegajad;

c) gaasipüüdurpudelid;

d) õhuvoolu reguleerimise ja mõõtmise seade;

e) seade süsinikdioksiidi väljapesemiseks süsinikdioksiidivaba õhu valmistamiseks; teise võimalusena võib kasutada õiges vahekorras segu (20 % O_2: 80 % N_2) CO_2-vabast balloonihapnikust ja CO_2-vabast balloonilämmastikust;

f) seade süsinikdioksiidi määramiseks kas tiitrimeetriliselt või mis tahes põhimõttel töötava anorgaanilise süsiniku analüsaatori abil;

g) membraanfiltratsiooniseade (ei ole kohustuslik);

h) DOC analüsaator (ei ole kohustuslik).

IV.2.2. **Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitrini.

IV.2.3. **Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, reovett, pinnavett või mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

IV.2.4. **Kolbide ettevalmistamine**

Järgmises näites on esitatud mahulised kogused ja kaalutised viieliitriste kolbide jaoks 3 l suspensiooniga. Väiksemate koguste kasutamisel võib koguseid vastavalt muuta, kuid tagada tuleb täpseks mõõtmiseks piisav süsinikdioksiidi eraldumine.

Igasse viieliitrisesse kolbi lisatakse 2 400 ml mineraalset toitelahust. Seejärel lisatakse sobiv kogus ettevalmistatud aktiivmuda (vt I.6.4.1 ja I.6.5) nii, et hõljumi kontsentratsioon lõplikus 3 liitris inokuleeritud segus ei ületa 30 mg/l. Teise võimalusena võib ettevalmistatud muda kõigepealt lahjendada mineraalse toitelahusega nii, et saadakse suspensioon kontsentratsiooniga 500 – 1 000 mg/l, misjärel lisatakse sellest kindel kogus viieliitrisesse kolbi nii, et saadakse lõppkontsentratsioon 30 mg/l; nõnda tagatakse suurem täpsus. Kasutada võib muid inokulaadiallikaid (vt I.6.4.2).

Inokuleeritud segusid aereeritakse üleöö CO_2-vaba õhuga, et puhastada süsteem süsinikdioksiidist.

▼B

Eraldi paralleelkolbidele lisatakse kindla koguse põhilahuse näol test- ja võrdlusaine nii, et neist tulenev DOC või TOC kontsentratsioon on 10–20 mg/l; mõned kolvid jäetakse kemikaalita inokulaadi kontrollproovideks. Vähelahustuvad testained lisatakse massi või mahu järgi otse kolbi või neid käsitletakse 3. liites kirjeldatud moel.

Vajaduse korral kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, lisades kolbi ülejäänud kolbidega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Vajaduse korral kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6). Proov steriliseeritakse sobivas kontsentratsioonis mürkaine lisamisega.

Enne seda täiendatakse suspensioonid kõigis kolmes kolvis CO_2-vaba õhuga aereeritud mineraalse toitelahusega 3 liitrini. Lisaks võib võtta proove DOC analüüsiks (vt II.4 liidet) ja/või spetsiifiliseks analüüsiks. Pesupudelid ühendatakse kolbide väljaviiguga.

Baariumhüdroksiidi kasutamisel ühendatakse iga viieliitrise kolviga järjestikku kolm pesupudelit, millest igaühes on 100 ml 0,0125 M baariumhüdroksiidlahust. Lahus ei tohi sisaldada sulfaadi ja karbonaadi sadet ja selle kontsentratsioon tuleb määrata vahetult enne kasutamist. Naatriumhüdroksiidi kasutamisel ühendatakse järjestikku kaks püüdurit, kusjuures teine on kontrollpüüdur, mis peab näitama, kas esimene absorbeeris kogu süsinikdioksiidi. Sobivad ka seerumipudeli sulguriga pesupudelid. Igasse pudelisse lisatakse 200 ml 0,05 M naatriumhüdroksiidi, mis on küllaldane kogu testaine täielikul lagunemisel tekkiva süsinikdioksiidi absorbeerimiseks. Isegi vahetult enne kasutamist valmistatud naatriumhüdroksiidi lahus sisaldab väikestes kogustes karbonaate, vastav viga korrigeeritakse nullproovi karbonaadikoguse lahutamisega.

IV.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral:

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov,

kolb 7: mürgisuse kontrollproov,

kolb 8: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

IV.2.6. **Katse tegemine**

Katset alustatakse CO_2-vaba õhu juhtimisega läbi suspensioonide kiirusega 30–100 ml/min. Süsinikdioksiidi absorbendist võetakse CO_2 sisalduse määramiseks regulaarselt proove. Esimese kümne päeva jooksul on soovitatav teha analüüse iga kahe või kolme päeva tagant, seejärel iga viie päeva tagant kuni 28. päevani, nii et saab määrata kümnepäevase aknaperioodi.

▼B

28. päeval võetakse proovid DOC ja spetsiifilise analüüsi jaoks (kui neid tehakse), mõõdetakse suspensioonide pH ja lisatakse igasse kolbi 1 ml kontsentreeritud vesinikkloriidhapet; kolbe aereeritakse üleöö, et kõrvaldada suspensioonides olev süsinikdioksiid. 29. päeval tehakse viimane eralduva süsinikdioksiidi analüüs.

CO_2 mõõtmise päevadel eemaldatakse kõige kolvipoolsem baariumhüdroksiidiga pesupudel ja tiitritakse hüdroksiidilahust 0,05 M HCl-ga, kasutades indikaatorina fenoolftaleiini. Ülejäänud pesupudelid nihutatakse ühe koha võrra kolvile lähemale ja paigutatakse kaugemasse otsa uus pesupudel 100 ml värske 0,0125 M baariumhüdroksiidiga. Tiitrimisi tehakse kas vastavalt vajadusele, näiteks siis, kui esimeses püüduris täheldatakse märgatavat sadet ja enne sademe teket teises pudelis või vähemalt kord nädalas. NaOH kasutamisel absorbendina võetakse süstlaga väike proov (mille suurus sõltub kasutatavast süsinikuanalüsaatorist) kolvipoolses pesupudelis olevast naatriumhüdroksiidilahusest. Proov süstitakse eraldunud süsinikdioksiidi otseseks määramiseks süsinikuanalüsaatori anorgaanilise süsiniku määrajasse.

Teise püüduri sisu analüüsitakse alles katse lõpus, et vajaduse korral lisada arvutustesse läbikandunud süsinikdioksiidi arvestav parandus.

IV.3. ANDMED JA ARUANDLUS

IV.3.1. **Tulemuste käsitlemine**

Püüdurisse kogutud CO_2 kogus leitakse tiitrimisel järgmise valemi järgi:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times v \times C_A) \times 44$$

kus:

V = 100 ml absorbeerimislahuse tiirimiseks kulunud HCl maht (ml),

C_B = baariumhüdroksiidilahuse kontsentratsioon (M),

C_A = vesinikkloriidhappelahuse kontsentratsioon (M),

kui C_B on 0,0125 M ja C_A on 0,05 M, kulub 100 ml baariumhüdroksiidi tiitrimiseks 50 ml lahust ja CO_2 mass leitakse järgmisest valemist:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{tiitrimiseks kulunud HCl (ml)} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Seega on teisendustegur tekkinud CO_2 massi (mg) arvutamisel tiitrimisel kulunud HCl mahust (ml) 1,1.

Vastavate tiitrimisandmete põhjal arvutatakse ainult inokulaadist tekkiva CO_2 ning inokulaadi ja testaine segust tekkiva CO_2 massid, nende vahe ongi ainult testainest tekkiva CO_2 mass.

Näiteks kui inokulaadiga kulub tiitrimisele 48 ml ning inokulaadi ja testaine seguga 45 ml,

CO_2 inokulaadist = 1,1 × (50–48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 inokulaadi ja testaine segust = 1,1 × (50–45) = 5,5 mg

on testainest tekkiva CO_2 mass 3,3 mg.

Biolagundumise protsent arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{eralduva } CO_2 \text{ mass (mg)} \times 100}{ThCO_2 \times \text{lisatud testainemass (mg)}}$$

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{eralduva } CO_2 \text{ mass (mg)} \times 100}{\text{katses lisatud TOC(mg)} \times 3{,}67}$$

kus 3,67 on teisendustegur (44/12) üleminekul süsiniku massilt süsinikdioksiidi massile.

Lagunemisprotsent mis tahes ajavahemiku järel leitakse kõigi mõõtmispäevale eelnevate päevade kohta arvutatud protsentuaalsete $ThCO_2$ väärtuste liitmisel.

Naatriumhüdroksiidiga absorbeerimisel arvutatakse tekkinud süsinikdioksiidi kogus, väljendatuna anorgaanilise süsinikuna (IC) milligrammides, korrutades IC kontsentratsiooni absorbendis absorbendi mahuga.

Lagunemisprotsent arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\%\text{ of } ThCO_2 = \frac{\text{IC katsekolvi (mg)} - \text{IC nullproovi(mg)}}{\text{Katseainen a lisatud TOC(mg)}} \times 100$$

DOC kõrvaldamise võib arvutada vastavalt punktile I.7. Need ja kõik ülejäänud tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

IV.3.2. **Tulemuste kehtivus**

Katseaine – mineraalse toitelahuse suspensiooni anorgaanilise süsiniku sisaldus katse algul peab olema vähem kui 5 % süsiniku üldsisaldusest (TC) ja eraldunud CO_2 summaarne kogus inokulaadiga nullproovi puhul ei tohiks katse lõpul üldjuhul ületada 40 mg/l lahuse kohta. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 70 mg CO_2/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata.

Vt ka punkti I.5.2.

IV.3.3. **Aruandlus**

Vt punkti I.8.

IV.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

SÜSINIKDIOKSIIDI ERALDUMISE KATSE

1. **LABOR**

2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**

3. **TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

▼B

Algkonts. toitelahuses: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Kolbi lisatud süsiniku koguhulk: ...mg C

$ThCO_2$:...mg CO_2

4. **INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: ... mg/l

5. **SÜSINIKDIOKSIIDI ERALDUMINE JA LAGUNDUVUS**

Meetod: Ba(OH)2/NaOH/muu

Aeg (päevades)	Tekkinud CO_2 Katselahus (mg)		Tekkinud CO_2 nullproov (mg)		Tekkinud CO_2 kumulatiivne (mg) (ja nullproovi vahe keskmine)		$ThCO_2$ kumulatiiv ne $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	keskmine	3 / 4	keskmine	1	2	1	2	keskmine
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Märkus.: Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

5. **SÜSINIKU ANALÜÜS** (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

Aeg (päevades)	Nullproov (mg/l)	Testaine (mg/l)
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) või inkubatsiooniperioodi lõpus.

▼B

$$\text{DOC Kõrvaldamisprotsent} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOOTILISE LAGUNEMISE KATSE** (pole kohustuslik)

$$\text{abiootilise lagunemise\%} = \frac{CO_2 - CO_2 \text{ teke steriilses kolvis 28 paeva jarel (mg)}}{ThCO_2\ (\text{mg})} \times 100$$

V. OSA **MANOMEETRILISE RESPIROMEETRIA KATSE** (meetod C.4-D)

V.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (100 mg/l testainet, ThOD-ga vähemalt 50–100 mg/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, segatakse kuni 28 päeva kinnises kolvis konstantsel temperatuuril (kõikumisega ± 1 °C või alla selle). Hapniku tarbimine määratakse kas konstantse gaasiruumala hoidmiseks vajaliku (elektrolüüsil saadud) hapniku koguse mõõtmisel või ruumala või rõhu (või mõlema) muutuse järgi seadmes. Tekkiv süsinikdioksiid absorbeeritakse kaaliumhüdroksiidi või muu sobiva absorbendi lahuses. Testaine hapnikutarve (mida on parandatud paralleelse inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThOD-st või KHT-st. Lisaks võib inkubeerimise algul ja lõpul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal arvutada ka esmase biolagundumise määra ja DOC analüüsi põhjal lõpliku biolagundumise määra.

V.2. KATSEMEETODI KIRJELDUS

V.2.1. **Seadmed**

a) sobiv respiromeeter;

b) termostaat täpsusega ± 1 °C või täpsem;

c) membraanfiltratsiooni seade (pole kohustuslik);

d) süsinikuanalüsaator (pole kohustuslik).

V.2.2. **Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitrini.

V.2.3. **Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, reovett, pinnavett ja mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

V.2.4. **Kolbide ettevalmistamine**

Põhilahustest valmistatakse eraldi test- ja võrdlusainete lahused mineraalses toitelahuses, üldjuhul kontsentratsiooniga 100 mg kemikaali/liitris (ThOD-ga vähemalt 50–100 mg/l).

▼B

ThOD arvutatakse ammooniumisoolade moodustumise põhjal, välja arvatud juhul, kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist, sel juhul eeldatakse arvutustes nitraadi moodustumist (vt II liidet punkti 2).

Kontrollitakse pH väärtusi ja viiakse need vajaduse korral 7,4± 0,2ni.

Vähelahustuvad ained tuleks lisada hilisemas faasis (vt allpool).

Testaine mürgisuse kontrollimisel valmistatakse ette veel üks lahus, mis sisaldab üksikute lahustega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Kui on vaja määrata füüsikalis-keemiline hapnikutarve, valmistatakse testaine lahus ThOD-ga üldjuhul 100 mg/l, mis steriliseeritakse sobiva mürkaine lisamisega (vt I.6.6).

Vähemalt kahtedesse paralleelkolbidesse lisatakse vajalikud kogused test- ja võrdlusainete lahuseid. Täiendavad kolvid valmistatakse ette ainult mineraalse toitelahusega (inokulaadi kontrollproovid) ning vajaduse korral test- ja võrdlusaine seguga ja steriilse lahusega.

Vähelahustuvad testained lisatakse selles faasis massi või mahu järgi otse kolbi või neid käsitsetakse 3. liites kirjeldatud moel. CO_2-püüduri kambritesse lisatakse kaaliumhüdroksiidi, naatronlubja graanuleid või muud absorbenti.

V.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral:

kolb 6: steriilne kontrollproov,

kolb 7: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

V.2.6. **Katse tegemine**

Kolbidel lastakse jõuda soovitud temperatuurini ning asjaomased kolvid inokuleeritakse ettevalmistatud aktiivmuda või muud päritolu inokulaadiga lõpliku hõljumi kontsentratsiooniga kuni 30 mg/l. Katseaparatuur pannakse kokku, käivitatakse segaja ning kontrollitakse seadme hermeetilisust ja alustatakse hapnikutarbe mõõtmist. Üldjuhul ei ole vaja katseaparatuuri rohkem jälgida, välja arvatud vajalike tulemuste registreerimine ja igapäevase temperatuuri- ja segamisrežiimi kontrollimine.

Hapnikutarve arvutatakse regulaarselt ja sageli loetavate näitude põhjal, seadme tootja ette nähtud meetodite abil. Inkubatsiooniperioodi lõpus, tavaliselt 28 päeva pärast, mõõdetakse kolbide pH, eriti kui hapnikutarve on madal või kõrgem kui $ThODNH_4$ (lämmastikku sisaldavate ühendite puhul).

▼B

Vajaduse korral võetakse respiromeetri kolbidest katse alguses ja lõpus proove DOA analüüsiks või spetsiifilise aine analüüsiks (vt II.4 liidet). Pärast proovi võtmist katse alguses peab teada olema kolbi jääva katsesuspensiooni maht. Kui hapniku tarbimine on tingitud lämmastikku sisaldavast testainest, mõõdetakse nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni tõus 28 päeva jooksul ja arvutatakse välja nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus (V liide).

V.3. ANDMED JA ARUANDLUS

V.3.1. **Tulemuste käsitlemine**

Testaine hapnikutarve (mg) kindlaksmääratud aja möödumisel (millest on lahutatud inokulaadiga nullproovi vastav näitaja sama aja kohta) jagatakse kasutatud testaine massiga. Nii saadakse BHT väärtus, mis on väljendatud hapniku massina (mg) testaine massi (mg) suhtes, st

$$\text{BHT} = \frac{(\text{Testaine hapnikutar ve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutar ve (mg)})}{(\text{Testaine kogus kolvis (mg)})}$$

= hapnikutarve (mg) testaine massiühiku (mg) kohta.

Biolagundumise protsent arvutatakse kas valemist:

$$\text{biolagundumise protsent} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BHT}(O_2(\text{mg})/\text{testain e (mg)})}{\text{ThOD}(O_2(\text{mg})/\text{testain e (mg)})} \times 100$$

või valemist

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(O_2(\text{mg})/\text{testain e (mg)})}{\text{COD}(O_2(\text{mg})/\text{testain e (mg)})} \times 100$$

Tuleb märkida, et kui need kaks meetodit ei anna alati samasugust tulemust, on eelistatav kasutada esimest meetodit.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb kasutada asjakohast ThOD-d (NH_4 või NO_3) vastavalt nitrifikatsiooni teadaolevale või eeldatavale toimumisele. Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, arvutatakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V liide).

Valikulistel orgaanilise süsiniku ja/või spetsiifilise aine määramistel arvutatakse lagunemisprotsent punktis I.7 kirjeldatud moel.

Kõik tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

V.3.2. **Tulemuste kehtivus**

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul on üldjuhul 20–30 mg O_2/l ega tohiks ületada 60 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 60 mg/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata. Kui pH jääb väljapoole vahemikku 6–8,5 ja testaine hapnikutarve on alla 60 %, tuleks katset testaine madalama kontsentratsiooniga korrata.

Vt ka punkti I.5.2.

▼B

V.3.3. **Aruandlus**

Vt punkti I.8.

V.4. **ANDMETABEL**

Järgneb andmetabeli näide.

MANOMEETRILISE RESPIROMEETRIA KATSE

1. **LABOR**

2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**

3. **TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... mg/l

Algkontsentratsioon toitelahuses, C_O: ... mg/l

Lahuse maht katsekolvis (V): ... ml

ThOD või KHT: ... O_2 (mg)/testaine (mg) (NH_4 või NO_3)

4. **INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: ... mg/l

5. **HAPNIKUTARVE: BIOLAGUNDUVUS**

		Aeg (päevades)											
		0		7		14			21			28	
Hapnikutarve (mg) testaine	1												
	2												
	a, keskmine												
Hapnikutarve (mg) nullproov	3												
	4												
	b, keskmine												
Parandatud BHT (mg)	$(a_1–b_m)$												
	$(a_2–b_m)$												
BHT mg testaine kohta	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Aeg (päevades)											
		0		7		14			21			28	
Lagunemisprotsent	D_1 (a_1)												
$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_2 (a_2)												
	Keskmine (*)												

V = lahuse maht katsekolvis
(*) D_1 ja D_2 ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

NB: Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

6. **NITRIFIKATSIOONI ARVESTAV PARANDUS** (vt V liidet)

Päev		0	28	Erinevus
i)	Nitraadi kontsentratsioon (mg N/liitris),			(N)
ii)	Hapnikuekvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Nitriti kontsentratsioon (mg N/liitris)			(N)
iv)	Hapnikuekvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv)	Summaarne hapnikuekvivalent	—	—	

7. **SÜSINIKU ANALÜÜS** (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

Aeg (päevades)	Nullproov (mg/l)	Testaine mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 ([1])	(C_{blt})	(C_t)

([1]) või inkubatsioonniperioodi lõpus

$$\% \text{ DOC kõrvaldamisprotsent} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPETSIIFILINE AINE** (pole kohustuslik)

S_b = kontsentratsioon füüsikalis-keemilises (steriilses) kontrollproovis 28 päeva möödumisel.

S_a = kontsentratsioon inokuleeritud kolvis 28 päeva möödumisel.

$$\% \text{ biolagundumise protesent} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOOTILISE LAGUNEMISE KATSE** (pole kohustuslik)

a = hapnikutarve steriilsetes kolbides 28 päeva möödumisel (mg)

$$\text{hapnikutarve testaine mg kohta} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(vt jaotiseid 1 ja 3)

$$\text{abiootilise lagunemise protsent} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

VI OSA **KINNISE PUDELI KATSE** (meetod C.4-E)

VI.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Testaine lahus mineraalses toitelahuses, üldjuhul kontsentratsiooniga 2–5 mg/l, inokuleeritakse suhteliselt väikese arvu segapopulatsiooni mikroorganismidega ja seda hoitakse täiesti täis suletud pudelites konstantsel temperatuuril. Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul lahustunud hapniku analüüsimisega. Testaine hapnikutarve (mida on parandatud paralleelse inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThOD-st või KHT-st.

VI.2. MEETODI KIRJELDUS

VI.2.1. **Seadmed**

a) Klaaskorkidega BHT pudelid mahuga näiteks 250–300 ml.

b) Vesivann või inkubaator pudelite termostateerimiseks konstantsel temperatuuril (± 1 °C või täpsem) pimedas.

c) Suured klaaspudelid (2–5 l) lahuste valmistamiseks ja BHT pudelite täitmiseks.

d) Hapnikuelektrood ja -mõõtur või seadmed ja reaktiivid Winkleri tiitrimiseks.

VI.2.2. **Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

1 (üks) ml lahuseid a kuni d segatakse kokku ja täiendatakse lahjendusveega 1 liitrini.

VI.2.3. **Inokulaadi valmistamine**

Inokulaat valmistatakse üldjuhul valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Veel üks võimalik inokulaadi allikas on pinnavesi. Üldjuhul lisatakse liitri lahuse kohta üks tilk (0,05 ml) kuni 5 ml filtraati; antud reoveele vastava optimaalse koguse määramiseks võib vaja olla eelkatseid (vt I.6.4.2 ja I.6.5).

VI.2.4. **Kolbide ettevalmistamine**

Mineraalset toitelahust aereeritakse tugevalt vähemalt 20 minutit. Igas katseseerias tuleb kasutada ainult samast partiist pärinevat mineraalset toitelahust. Üldjuhul on lahus kasutusvalmis pärast 20tunnist katsetemperatuuril seismist. Kontrollimiseks määratakse lahustunud hapniku kontsentratsioon, mis peaks 20 °C juures olema umbes 9 mg/l. Kõik ülekande- ja täitmisoperatsioonid õhuga küllastatud toitelahusega tuleb teha mullivabalt, näiteks sifooni abil.

▼B

Test- ja võrdlusainete uurimiseks üheaegsetes katseseeriates valmistatakse ette paralleelsed BHT pudelite rühmad. Katses kasutatakse küllaldast arvu BHT pudeleid, sealhulgas inokulaadiga nullproove, nii et soovitatavate ajavahemike, näiteks 0, 7, 14, 21 ja 28 päeva järel, saab hapnikutarvet mõõta vähemalt kahes paralleelis. Kümnepäevase akna määramiseks võib vaja olla täiendavaid pudeleid.

Suured pudelid täidetakse põhjalikult aereeritud mineraalse toitelahusega umbes ühe kolmandiku ulatuses. Seejärel lisatakse eraldi suurtesse pudelitesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid nii, et kemikaalide lõplik kontsentratsioon ei ületa üldjuhul 10 mg/l. Täiendavas suures pudelis olevale kemikaalivabale kontrolltoitelahusele kemikaale ei lisata.

Et mitte piirata inokulaadi aktiivsust, ei tohi lahustunud hapniku kontsentratsioon BHT pudelites langeda alla 0,5 mg/l. Seega on testaine kontsentratsioon piiratud umbes 2 mg/l. Raskestilagunevate ja madala ThOD-ga ühendite puhul võib siiski kasutada kontsentratsiooni 5–10 mg/l. Mõningatel juhtudel võib soovitada teha paralleelseid katseseeriaid kahe erineva testaine kontsentratsiooniga, näiteks 2 ja 5 mg/l. ThOD arvutatakse üldjuhul ammooniumisoolade moodustumise põhjal, kuid kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist või selle toimumine on teada, arvutatakse see nitraadi moodustumise põhjal ($ThODNO_3$: vt II liite punkti 2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, parandatakse tulemust, arvestades analüütiliselt leitud nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutusi (vt V liidet).

Testaine mürgisuse uurimisel (näiteks madala biolagunduvuse tulemuse puhul) on vaja veel üht pudeliseeriat.

Valmistatakse ette veel üks suur pudel, mis sisaldab aereeritud mineraalset toitelahust (umbes 1/3 pudeli mahust) ja ülejäänud suurte pudelitega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Lahused suurtes pudelites inokuleeritakse töödeldud reoveega (1 tilk ehk umbes 0,05 ml kuni 5 ml/l) või muu inokulaadi, nagu jõeveega (vt I.6.4.2). Seejärel täiendatakse lahused aereeritud mineraalse toitelahusega vajaliku mahuni, kasutades piisava segunemise saavutamiseks pudeli põhjani ulatuvat voolikut.

VI.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Tüüpilises katses kasutatakse järgmisi pudeleid:

— vähemalt 10 pudelit testaine ja inokulaadiga (katsesuspensioon);

— vähemalt 10 pudelit ainult inokulaadiga (inokulaadiga nullproov);

— vähemalt 10 pudelit võrdlusaine ja inokulaadiga (protseduuri kontrollproov),

▼B

— ning vajaduse korral 6 pudelit nii testaine, võrdlusaine kui ka inokulaadiga (mürgisuse kontrollproov). Kümnepäevase akna määramiseks võib aga vaja olla umbes kahekordset arvu pudeleid.

VI.2.6. Katse tegemine

Kõik valmis lahused viiakse kohe vastavasse BHT pudelite rühma, kasutades voolikut, mille ots on BHT pudelite täielikuks täitmiseks vastava suure pudeli alumises veerandis (mitte põhjas). Õrnalt koputades eemaldatakse õhumullid. Nullhetkel määratakse kõigis pudelites Winkleri meetodi või hapnikuelektroodi abil kohe lahustunud hapnik. Proovid võib mangaan(II)sulfaadi ja naatriumhüdroksiidi (esimese Winkleri reaktiivi) abil konserveerida hilisemaks analüüsiks, kasutades Winkleri meetodit. Hoolikalt suletud pudeleid, milles hapnik on fikseeritud pruuni mangaan(III)oksiidi hüdraadina, hoitakse enne Winkleri meetodi järgmiste etappidega jätkamist pimedas 10–20 °C juures kõige rohkem 24 tundi. Ülejäänud paralleelpudelid suletakse õhumullide pudelitesse jäämise vältimiseks korgiga ja inkubeeritakse 20 °C juures pimedas. Iga katseseeriaga peab kaasnema täielik paralleelseeria inokuleeritud, testaineta toitelahuse uurimiseks. Igast seeriast võetakse 28 päeva jooksul kindlate ajavahemike järel (vähemalt kord nädalas) korraga vähemalt kaks pudelit lahustunud hapniku määramiseks.

Nädalaste vahedega võetud proovid võimaldavad määrata kõrvaldamisprotsendi 14päevases aknas, 3–4päevaste vahedega võetud proovid võimaldavad määrata kümnepäevase akna, selleks on vaja umbes kaks korda rohkem pudeleid.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb tulemustesse teha nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus. Selleks määratakse hapnikuelektroodi abil lahustunud hapniku kontsentratsioon ja võetakse BHT pudelist nitriti ja nitraadi analüüsiks proov. Nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni tõusu järgi arvutatakse välja vastav hapnikutarve (vt V liidet).

VI.3. ANDMED JA ARUANDLUS

VI.3.1. **Tulemuste käsitlemine**

Kõigepealt arvutatakse iga ajavahemiku BHT, lahutades testaine hapnikutarbest inokulaadiga nullproovi hapnikutarbe (mg/l). Suhtelise BHT (hapniku ja testaine masside (mg) suhte) saamiseks jagatakse parandatud hapnikutarve testaine kontsentratsiooniga (mg/l). Protsentuaalne biolagunduvus arvutatakse suhtelise BHT jagamisel suhtelise (II liite punktis 2 kirjeldatud viisil arvutatud) ThOD-ga või KHT-ga (mis on määratud analüütiliselt, vt II.3 liidet), seega:

$$\mathrm{BOD} = \frac{\text{Testaine hapnikutar ve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutar (mg)}}{\text{Testaine kogus kolvis (mg)}}$$

▼B

= hapnikutarve (mg) testaine massiühiku (mg) kohta

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{BHT}(O_2(\text{mg})/\text{testain e (mg)})}{\text{ThOD}(O_2(\text{mg})/\text{testain e (mg)})} \times 100$$

või

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{BHT}(O_2\text{mg}/\text{testain emg})}{\text{KHT}(O_2\text{mg}/\text{testain emg})} \times 100$$

Tuleb märkida, et kui need kaks meetodit ei anna alati samasugust tulemust, on eelistatav kasutada viimast meetodit.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb kasutada asjakohast ThOD-d (NH_4 või NO_3) vastavalt nitrifikatsiooni teadaolevale või eeldatavale toimumisele (II liite punkt 2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, arvutatakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V liide).

VI.3.2. **Tulemuste kehtivus**

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul ei tohiks olla suurem kui 1,5 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad, tuleks katsetehnika üle vaadata. Lahustunud hapniku kontsentratsioon katsepudelites ei tohiks millalgi langeda alla 0,5 mg/l. Sellised madalad hapnikusisaldused saab kehtivaks lugeda ainult juhul, kui kasutatav lahustunud hapniku määramise meetod võimaldab selliseid sisaldusi täpselt määrata.

Vt ka punkti I.5.2.

VI.3.3. **Aruandlus**

Vt punkti I.8.

VI.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

KINNISE PUDELI KATSE

1. **LABOR**

2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**

3. **TESTAINE**

   Nimi:

   Põhilahuse kontsentratsioon: ... mg/l

   Algkontsentratsioon pudelis: ... mg/l

   ThOD või KHT: ... O_2 (mg)/testaine (mg)

4. **INOKULAAT**

   Allikas:

   Töötlus:

▼B

Kohandamine, kui seda tehti:

Kontsentratsioon katsesegus: ... mg/l

5. **LAHUSTUNUD HAPNIKU MÄÄRAMINE**

Meetod: Winkler/elektrood

Kolbide analüüsitulemused

Inkubatsiooniaeg (d)			Lahustunud hapnik (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Nullproov (kemikaalita)	1	C_1				
	2	C_2				
Keskmine	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testaine	1	a_1				
	2	a_2				
Keskmine	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Märkus. Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

6. **NITRIFIKATSIOONI ARVESTAV PARANDUS** (vt V liidet**)**

Inkubatsiooniaeg (d)		0	n_1	n_2	n_3
i)	Nitraadi kontsentratsioon (mg N/liitris)				
ii)	Nitraadi kontsentratsiooni muutus (mg N/liitris)	—			
iii)	Hapnikuekvivalent (mg/l)	—			
iv)	Nitriti kontsentratsioon (mg N/liitris)				
v)	Nitriti kontsentratsiooni muutus (mg N/liitris)	—			
vi)	Hapnikuekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi)	Summaarne hapnikuekvivalent (mg/l)	—			

7. **LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE: LAGUNEMISPROTSENT**

	Tarbimine n päeva pärast (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
1. KOLB: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
2. KOLB: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Tarbimine n päeva pärast (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
1. KOLB: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{katsekonts.} \times \text{ThOD kemikaal}}$				
2. KOLB: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{katsekonts.} \times \text{ThOD kemikaal}}$				
keskmine %D (*) $= \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Kordustulemuste olulise erinevuse puhul mitte keskmistada.

m_{to} = väärtus katsekolvis ajahetkel 0

m_{tx} = väärtus katsekolvis ajahetkel x

m_{b0} = nullproovi keskmine väärtus ajahetkel 0

m_{bx} = nullproovi keskmine väärtus ajahetkel x

Teha tuleb ka nitrifikatsiooni arvestav parandus jaotise 6 punktist iii + vi.

8. **LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE NULLPROOVIDES**

Nullproovi hapnikutarve: ($m_{b0} - m_{b28}$) mg/l. Nullproovi hapnikutarve on oluline katse kehtivuse seisukohalt. See peaks olema alla 1,5 mg/l.

VII OSA **MITI KATSE** (meetod C.4-F)

VII.1. PÕHIMÕTE

28 päeva kestel mõõdetakse automaatselt pimedas, suletud respiromeetris 25 ± 1 °C juures oleva, pidevalt segatava, testainest ja mineraalsest toitelahusest koosneva, spetsiaalselt kasvatatud, adapteerimata mikroorganismidega inokuleeritud lahuse või suspensiooni hapnikutarvet. Tekkinud süsinikdioksiid absorbeeritakse naatronlubjaga. Biolagunduvust väljendatakse nullproovi hapnikutarbe võrra parandatud hapnikutarbe protsendina teoreetilisest hapnikutarbest (ThOD). Lisaks arvutatakse inkubeerimise algul ja lõpul tehtava täiendava keemilise analüüsi ja soovi korral ka DOC analüüsi põhjal esmase biolagundumise määr.

VII.2. MEETODI KIRJELDUS

VII.2.1. **Seadmed**

a) Automaatne elektrolüütiline BHT mõõtur või respiromeeter, tavaliselt kuue 300 ml pudeliga ja topsidega CO_2 absorbendi jaoks.

▼B

b) Püsiva temperatuuriga ruum ja/või veevann temperatuuriga 25 °C, lubatava kõikumisega ± 1 °C või alla selle.

c) Membraanfiltratsiooni seade (pole kohustuslik).

d) Süsinikuanalüsaator (pole kohustuslik).

VII.2.2. **Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Analüüsipuhastest reaktiividest ja veest (1.6.1) valmistatakse järgmised põhilahused:

a)	Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaaliumvesinikfosfaat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinaatriumvesinikfosfaatdodekahüdraat, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	44,60 g
	Ammooniumkloriid, NH_4Cl	1,70 g
	Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini	
	Lahuse pH peaks olema 7,2	
b)	Magneesiumsulfaatheptahüdraat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini	
c)	Veevaba kaltsiumkloriid, $CaCl_2$	27,50 g
	Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini	
d)	Raud(III)kloriidheksahüdraat, $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	0,25 g
	Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini	

3 ml igast lahusest a kuni d segatakse kokku ja täiendatakse 1 liitrini.

VII.2.3. **Inokulaadi valmistamine**

Võetakse värsked proovid vähemalt kümnest kohast, peamiselt piirkondadest, kus kasutatakse ja kuhu suunatakse mitmesuguseid kemikaale. Üheliitrised muda, pindmise mullakihi, vee- jms proovid võetakse näiteks olme- ja tööstusliku heitvee puhastitest, jõgedest, järvedest ja meredest ning segatakse need hoolikalt kokku. Pärast hõljumi kõrvaldamist ja mõningast seismist viiakse supernatandi pH naatriumhüdroksiidi või fosforhappe abil väärtuseni 7 ± 1.

Sobiva koguse filtritud supernatandiga täidetakse edaspidi regulaarselt täidetav ja osaliselt tühjendatav aktiivmuda anum ja vedelikku aereeritakse umbes 23,5 tundi. 30 minutit pärast aereerimise lõppu kõrvaldatakse umbes kolmandik supernatandist ja lisatakse settinud materjalile samas mahus lahust (pH 7), mis sisaldab 0,1 % glükoosi, 0,1 % peptooni ja kaaliumdivesinikfosfaati, ning jätkatakse aereerimist. Protseduuri korratakse iga päev. Mudareservuaari tuleb käidelda hea tava kohaselt: väljavool peab olema selge, temperatuur peaks olema 25 ± 2 °C, pH peaks olema 7 ± 1, muda peaks hästi settima, aeratsioon peaks segu pideva aeroobsuse tagamiseks olema küllaldane, segu peaks sisaldama algloomi ning muda aktiivsust võrdlusaine suhtes tuleks kontrollida vähemalt iga kolme kuu tagant. Muda võib inokulaadina kasutada pärast vähemalt ühekuulist töötlemist, aga hiljemalt nelja kuu pärast. Seejärel võetakse regulaarsete vaheaegade järel vähemalt kord kolme kuu jooksul jälle vähemalt kümnest paigast eespool kirjeldatud proovid.

▼B

Et tagada värske ja vana muda ühesugune aktiivsus, segatakse kasutuses oleva aktiivmuda filtritud supernatant võrdsetes kogustes vahetult enne kogutud kümne allika segu filtritud supernatandiga ja kultiveeritakse saadud segu eespool kirjeldatud moel. Inokulaadiks võetakse muda 18–24 t pärast selle söötmist.

VII.2.4. **Kolbide ettevalmistamine**

Valmistatakse ette järgmised kuus kolbi:

nr 1: testaine lahjendusvees, kontsentratsioonis 100 mg/l;

nr 2, 3 ja 4: testaine mineraalses toitelahuses, kontsentratsioonis 100 mg/l;

nr 5: võrdlusaine (nt aniliin) mineraalses toitelahuses, kontsentratsioonis 100 mg/l;

nr 6: ainult mineraalne toitelahus.

Vähelahustuvad testained lisatakse massi või mahu järgi otse katsesegusse või käsitsetakse neid 3. liites kirjeldatud moel, kuid lahusteid ega emulgaatoreid kasutada ei tohiks. Kõikidele kolbidele lisatakse vastavasse topsi CO_2 absorbent. pH kolbides nr 2, 3 ja 4 viiakse väärtuseni 7,0.

VII.2.5. **Katse tegemine**

Kolvid nr 2, 3 ja 4 (katsesuspensioonid), nr 5 (inokulaadi aktiivsuse kontrollproov) ja nr 6 (inokulaadiga nullproov) inokuleeritakse sellise väikese koguse inokulaadiga, et hõljumi kontsentratsioon segus oleks 30 mg/l. Abiootilist kontrollproovi kolvis nr 1 ei inokuleerita. Katseaparatuur pannakse kokku, kontrollitakse seadme hermeetilisust, käivitatakse segajad ja alustatakse pimeduses hapnikutarbe mõõtmist. Iga päev kontrollitakse temperatuuri, segajaid ja kulonomeetrilist hapnikutarbe meerikut ning märgitakse üles kõik kolbide sisu värvuse muutused. Sobival moel, näiteks kuue kanaliga meeriku abil jälgitakse vahetult kõigi kolbide BHT-d. Inkubatsiooniperioodi lõpus, tavaliselt 28 päeva möödumisel, mõõdetakse kolbide pH ja määratakse testaine jääkkontsentratsioon, kõigi vaheühendite kontsentratsioonid ja vees lahustuva ühendi puhul DOC kontsentratsioon (II.4 liide). Lenduvate kemikaalide puhul tuleb olla eriti hoolikas. Kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist, mõõdetakse võimaluse korral nitriti ja nitraadi kontsentratsioon.

VII.3. ANDMED JA ARUANDLUS

VII.3.1. **Tulemuste käsitlemine**

Testaine hapnikutarve (mg) kindla aja möödumisel (millest on lahutatud inokulaadiga nullproovi vastav näitaja sama aja kohta) jagatakse kasutatud testaine massiga. Nii saadakse BHT väärtus, mis on väljendatud hapniku massina (mg) testaine massi (mg) suhtes, st:

$$\text{BHT} = \frac{(\text{Testaine hapnikutar ve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutar ve (mg)})}{(\text{Testaine kogus kolvis (mg)})}$$

= hapnikutarve (mg)/testaine (mg).

▼B

Biolagundumise protsent arvutatakse seejärel valemist:

$$\text{biolagundumise protsent} = \text{ThOD\%}\ \frac{\text{BHT } (O_2(\text{mg})/\text{testain e (mg)})}{\text{ThOD } (O_2(\text{mg})/\text{testain e (mg)})} \times 100$$

Segude puhul arvutatakse ThOD elementanalüüsi tulemuste põhjal, käsitledes segu ühendina. Kasutada tuleb asjakohast ThOD-d ($ThODN_{H4}$ või $ThOD_{NO3}$) vastavalt nitrifikatsiooni toimumisele või mittetoimumisele (II liite punkt 2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, tehakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus, mis arvutatakse välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V liide).

Spetsiifilise (lähte-)aine kao järgi arvutatakse esmase biolagundumise protsent (vt I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Kui testaine sisaldus füüsikalis-keemilist kadu mõõtvas kolvis nr 1 on vähenenud, registreeritakse see ja selles kolvis (S_b) oleva testaine kontsentratsiooni kasutatakse 28 päeva möödumisel biolagundumise protsendi arvutamisel.

DOC analüüside (pole kohustuslik) tegemisel arvutatakse biolagundumise protsent valemist:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

vastavalt kirjeldusele punktis I.7.1. Kui DOC sisaldus füüsikalis-keemilist kadu mõõtvas kolvis nr 1 on vähenenud, kasutatakse DOC kontsentratsiooni selles kolvis biolagundumise protsendi arvutamisel.

Kõik tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

VII.3.2. **Tulemuste kehtivus**

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul on üldjuhul 20–30 mg O_2/l ega tohiks ületada 60 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 60 mg/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata. Kui pH jääb väljapoole vahemikku 6–8,5 ja testaine hapnikutarve on alla 60 %, tuleks katset testaine madalama kontsentratsiooniga korrata.

Vt ka punkti I.5.2.

Kui hapnikutarbe põhjal arvutatud aniliini lagunemisprotsent ei ole 7 päeva jooksul suurem kui 40 % ja 14 päeva jooksul suurem kui 65 %, loetakse katse tühiseks.

VII.3.3. **Aruandlus**

Vt punkti I.8.

VII.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

MITI (I) KATSE

1. **LABOR**

2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**

▼B

3. **TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses, C_0: ... (kemikaali sisaldus, mg/l

Katsesegu maht, V: … ml

ThOD: ... mg O_2/l

4. **INOKULAAT**

Mudavõtukohad:

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Hõljumi kontsentratsioon aktiivmudas pärast sünteetilise reoveega aklimatiseerimist = ... mg/l

Aktiivmuda maht liitri lõpliku lahuse kohta = ... ml

Muda kontsentratsioon lõplikus lahuses = ... mg/l

5. **HAPNIKUTARVE: BIOLAGUNDUVUS**

Kasutatava respiromeetri tüüp:

			Aeg (päevades)				
			0	7	14	21	28
Hapnikutarve (mg), testaine	a_1						
	a_2						
	a_3						
Hapnikutarve (mg), nullproov	b						
Parandatud hapnikutarve (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
BHT mg testaine kohta	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	1. kolb					
		2. kolb					
		3. kolb					
Lagunemisprotsent BOD/ThOD × 100 $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Keskmine (*)					

(*) Kordustulemuste olulise erinevuse puhul mitte keskmistada.

▼B

NB: Võrdlusaine jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

6. **SÜSINIKU ANALÜÜS** (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

Kolb	DOC				DOC kõrvalda-misprotse-nt	Keskmine
	Mõõdetud		Parandatud			
Vesi + testaine	a				—	—
Muda + testaine	b_1		b_1–c			
Muda + testaine	b_2		b_2–c			
Muda + testaine	b_3		b_3–c			
Testaineta kontrollproov	c		—		—	—

$$\text{kõrvaldamisprotsent} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **SPETSIIFILISE KEEMILISE ANALÜÜSI ANDMED**

	Testaine jääk katse lõpus	Lagunemisprotsent
Nullproov veega	S_b	
Inokuleeritud toitelahus	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Lagunemisprotsent arvutatakse kolbide a, a_2 ja a_3 puhul.

8. **MÄRKUSED**

Lisada tuleks BHT kõver ajas, kui see koostati.

▼B

I liide

LÜHENDID JA MÕISTED

DO: lahustunud hapnik (mg/l) on vesikeskkonnaga proovis lahustunud hapniku kontsentratsioon.

BHT: bioloogiline hapnikutarve (g) on mikroorganismide poolt testaine metaboliseerimisel tarvitatud hapniku kogus, väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena (vt meetodit C.5).

KHT: keemiline hapnikutarve (g) on testaine oksüdeerimisel kuuma happelise dikromaadiga tarvitatud hapniku kogus, näitab oksüdeeritava materjali sisaldust; väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena (vt meetodit C.6).

DOC: lahustunud orgaaniline süsinik on lahuses olev süsinik, mis läbib 0,45 μm filtri või jääb supernatanti 15minutilisel tsentrifuugimisel 40 000 m/s^{-2} (± 4 000 g) juures.

ThOD: teoreetiline hapnikutarve (mg) on aine täielikuks oksüdeerimiseks vajalik hapnikukogus; arvutatakse brutovalemi järgi (vt II liite punkti 2) ning väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena.

$ThCO_2$: teoreetiline süsinikdioksiid (mg) on arvutuslik süsinikdioksiidi kogus, mis tekib katseühendi teadaolevast või määratud süsinikusisaldusest katseühendi täielikul mineraliseerumisel; väljendatakse ka mg katseühendi kohta eraldunud süsinikdioksiidi kogusena (mg).

TOC: proovi kogu orgaaniline süsinik on lahuses ja suspensioonis oleva orgaanilise süsiniku sisalduse summa.

IC: anorgaaniline süsinik.

TC: üldsüsinik on proovis oleva orgaanilise ja anorgaanilise süsiniku summa.

Esmane biolagundumine:

bioloogilisest toimest tingitud muutus aine keemilises struktuuris, mille tulemusel see aine kaotab mingi spetsiifilise omaduse.

Lõplik biolagundumine (aeroobne):

lagunemise määr, mille puhul mikroorganismid on katseühendi täielikult ära tarvitanud ja muutnud selle süsinikdioksiidiks, veeks, mineraalsooladeks ja uute mikroobsete rakkude osaks (biomassiks).

Bioloogiliselt kergesti lagunduv.

teatavad kindlaksmääratud lõpliku biolagunduvuse sõelkatsed läbinud kemikaalide rangelt määratlemata klassifikatsioon; need katsed on nii ranged, et võib eeldada, et veekeskkonnas aeroobsetes tingimustes biolagunduvad need ühendid kiiresti ja täielikult.

▼B

Potentsiaalselt biolagunduv:

klassifikatsioon kemikaalide puhul, mille (esmase või lõpliku) biolagunduvuse kohta mis tahes tunnustatud biolagunduvuse katses on kindlaid tõendeid.

Biotöödeldavus:

ühendite kõrvaldatavus biopuhastusjaamades, rikkumata puhastusprotsesside normaalset käiku. Üldjuhul on bioloogiliselt kergesti lagunduvad ühendid biotöödeldavad, samal ajal kui kõik potentsiaalselt biolagunduvad ühendid ei ole biotöödeldavad. Toimida võivad ka abiootilised protsessid.

Ooteaeg:

kõrvaldamiskatses ajavahemik inokulatsioonist kuni hetkeni, kus lagunemine on jõudnud vähemalt 10 %ni. Ooteaja pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

Lagunemisaeg:

aeg ooteaja lõpust hetkeni, mil on saavutatud 90 % maksimaalsest lagunemisest.

Kümnepäevane aken

on 10 % lagunemise saavutamisele vahetult järgnevad kümme päeva.

▼B

2. liide

SOBIVATE SUMMAARSETE PARAMEETRITE ARVUTAMINE JA MÄÄRAMINE

Olenevalt valitud meetodist on vajalikud teatavad summaarsed parameetrid. Järgmine jaotis kirjeldab nende väärtuste leidmist. Nende parameetrite kasutamist on kirjeldatud üksikute meetodite juures.

1. **Süsinikusisaldus**

Süsinikusisaldus arvutatakse testaine teadaoleva elemendilise koostise põhjal või määratakse elementanalüüsil.

2. **Teoreetiline hapnikutarve (ThOD)**

Teoreetilise hapnikutarbe (ThOD) saab arvutada siis, kui elemendiline koostis on teada või määratakse elementanalüüsil. Järgmise ühendi puhul:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

on see nitrifikatsiooni mitteesinemisel

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

ja nitrifikatsiooni esinemisel

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Keemiline hapnikutarve (KHT)**

Keemiline hapnikutarve (KHT) määratakse meetodi C.6 kohaselt.

4. **Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC)**

Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC) on määratletud kui mis tahes vees oleva, 0,45 μm filtrit läbiva aine või segu koostises olev orgaaniline süsinik.

Katseanumatest võetakse proovid ja filtritakse kohe sobiva membraanfiltriga filtrimisseadmes. Esimesed 20 ml filtraati (väikeste filtrite kasutamisel võib kogust vähendada) jäetakse kõrvale. 10–20 ml või süstimisel väiksemad kogused (maht sõltub süsinikuanalüsaatori jaoks vajalikust kogusest) jäetakse süsiniku analüüsimiseks alles. DOC kontsentratsioon määratakse orgaanilise süsiniku analüsaatori abil, mis suudab täpselt mõõta süsiniku kontsentratsiooni, mis on 10 % DOC kontsentratsioonist katse alguses või sellest madalam.

Filtritud proove, mida ei saa analüüsida samal tööpäeval, võib säilitada külmikus 2–4 °C juures kuni neli tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

Märkused:

Membraanfiltrid on sageli hüdrofiilsuse suurendamiseks immutatud pindaktiivsete ainetega. Seega võib filter sisaldada mitu mg lahustuvat orgaanilist süsinikku, mis segaks biolagunduvuse määramist. Pindaktiivsed ained ja muud lahustuvad orgaanilised ühendid kõrvaldatakse filtritest kolme tunniajase keetmisega deioniseeritud vees. Filtreid võib seejärel nädal aega vees hoida. Ühekordse filterpadruni kasutamisel tuleb iga partii puhul kontrollida, et see ei eralda lahustuvat orgaanilist süsinikku.

▼B

Olenevalt membraanfiltri tüübist võib testaine sellel adsorbeeruda. Seetõttu on soovitatav veenduda, et testainet filtrisse ei jää.

DOC eristamisel TOCst võib filtrimise asemel kasutada 15minutilist tsentrifuugimist 40 000 m/s^{-2} (4 000 g) juures. Kui DOC algkontsentratsioon on alla 10 mg/l, ei ole see meetod usaldusväärne, kuna kõiki baktereid ei kõrvaldata või lahustatakse osa süsinikust bakteriplasmas.

KIRJANDUS

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 388 409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammunter-chlammunter-suchung, Summarische Wirkungs- and Stoffkenngr6Ben (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuβormenausschuβ Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut fürür Normung e.V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984,984, vol 133 (1), 169.

▼B

3. liide

VÄHELAHUSTUVATE AINETE BIOLAGUNDUVUSE HINDAMINE

Biolagunduvuse katsetes vähelahustuvate ainetega tuleks erilist tähelepanu pöörata järgmistele asjaoludele.

Sellal kui homogeensed vedelikud tekitavad proovi võtmisel harva probleeme, on soovitatav tahked ained sobival moel homogeniseerida, et vältida mittehomogeensusest tingitud vigu. Eriti hoolikas tuleb olla siis, kui on vaja mõnemilligrammiseid proove suure lisandite sisaldusega segudest või ainetest.

Katsete käigus võib kasutada mitmesuguseid loksutamisviise. Loksutada tuleks ainult aine dispergeerituna hoidmiseks vajalikul määral, vältides hoolikalt ülekuumutamist, liigset vahutamist ja liigseid nihkejõude.

Kasutada võib emulgaatorit, mille abil saadakse ainest stabiilne dispersioon. Emulgaator ei tohiks olla bakteritele mürgine ega olla katse tingimustel biolagunduv või vahtu tekitav.

Lahustitele kehtivad samad nõuded nagu emulgaatoritele.

Tahkete testainete puhul ei ole tahkeid kandjaid soovitatav kasutada, küll aga võivad need olla sobivad õlitaoliste ainete puhul.

Abiainete, nagu emulgaatorite, lahustite ja kandjate kasutamisel tuleks teha nullproov abiainega.

Vähelahustuvate ühendite biolagunduvuse uurimiseks sobivad respiromeetrilistest katsetest nii CO_2, BHT kui ka MITI katse.

KIRJANDUS

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B

IV liide

INOKULAADI SUHTES OLETATAVALT MÜRGISTE AINETE BIOLAGUNDUVUSE HINDAMINE

Kui aine osutub kohese biolagunduvuse katses näiliselt mittelagunevaks, on inhibeerivuse ja inertsuse eristamise vajaduse korral soovitatav kasutada järgmist meetodit (Reynolds jt, 1987).

Mürgisuse ja biolagunduvuse katsetes tuleks kasutada samasuguseid või identseid inokulaate.

Kohese biolagunduvuse katsetes uuritud ainete mürgisuse hindamiseks peaks sobima muda hapnikutarbe inhibeerimise (aktiivmuda hapnikutarbe inhibeerimiskatse – direktiiv 88/302/EMÜ), BHT ja/või kasvu pidurdumise meetodid või nende kombinatsioon.

Kui mürgisusest tulenevat inhibeerumist soovitakse vältida, on kohese biolagunduvuse katsetes soovitatav kasutada testaine kontsentratsioone, mis on väiksemad kui 1/10 mürgisuse katsetes leitud EC_{50} väärtustest (ehk väiksemad kui EC_{20} väärtused). Ühendite puhul, mille EC_{50} on kõrgem kui 300 mg/l, kohese biolagunduvuse katsetes tõenäoliselt mürgist mõju ei ilmne.

EC_{50} väärtused alla 20 mg/l tekitavad järgnevates katsetes eeldatavalt tõsiseid probleeme. Kasutada tuleks madalaid katsekontsentratsioone, mistõttu tuleb kasutada ranget ja tundlikku kinnise pudeli katset või ^{14}C-märgistatud materjali. Aklimatiseerunud inokulaat võib võimaldada kasutada testaine kõrgemaid kontsentratsioone. Viimasel juhul ei ole aga täidetud kohese biolagunduvuse katse konkreetne kriteerium.

KIRJANDUS

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

V Liide

NITRIFIKATSIOONI HAPNIKUTARVET ARVESTAV PARANDUS

Lämmastikku mittesisaldavate testainete puhul on nitrifikatsiooni arvestamatajätmisest tingitud viga testainete biolagundumise hapnikutarbe hindamisel tühine (ei ületa 5 %), isegi kui toitelahuse ammoniakaalse lämmastiku oksüdatsioon toimub ebaühtlaselt, näiteks erinevustega testainega pudelite ja nullproovidega anumate vahel. Lämmastikku sisaldavate testainete puhul võivad aga ilmneda tõsised vead.

Kui nitrifikatsioon on toimunud, kuid ei ole täielik, võib nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutuste määramisel parandada segu mõõdetud hapnikutarvet järgmiste valemite põhjal ammooniumiooni nitritiks ja nitraadiks oksüdeerimisel kuluva hapnikukoguse võrra:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCI + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Summaarselt:

$$2\ HN_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Valemi 1 põhjal kulub ammooniumkloriidi (NH_4Cl) koosseisus oleva 28 g lämmastiku oksüdeerimisel nitritiks 96 g hapnikku, st vastav teisendustegur on 3,43 (96/28). Samamoodi kulub valemi 3 põhjal 28 g lämmastiku oksüdeerimisel nitraadiks 128 g hapnikku, st vastav teisendustegur on 4,57 (128/28).

Kuna need reaktsioonid on järjestikused ja neid viivad läbi erinevad bakteriliigid, võib nitriti kontsentratsioon nii väheneda kui ka suureneda; viimasel juhul tekib vastav kogus nitraati. Seega on nitraadi tekkel kuluv hapnikukogus 4,57kordne nitraadi kontsentratsiooni tõusuga võrreldes, sellal kui nitriti tekkel kuluv hapnikukogus on 3,43kordne nitriti kontsentratsiooni tõusuga võrreldes ning nitriti kontsentratsiooni vähenemisega seotud hapnikukadu – 3,43kordne nitriti kontsentratsiooni vähenemisega võrreldes.

Seega:

O_2 kulu nitraadi tekkel = 4,57 x nitraadi kontsentratsiooni tõus (4)

ja

O_2 kulu nitriti tekkel = 3,43 x nitriti kontsentratsiooni tõus (5)

ja

O_2 kadu nitriti kadumisel = –3,43 x nitriti kontsentratsiooni vähenemine (6)

Seega

O_2 kulu nitrifikatsioonil = ± 3,43 x nitriti kontsentratsiooni muutus + 4,57 x nitraadi kontsentratsiooni tõus (7)

ja seega

O_2 kulu süsiniku oksüdeerimisel = vaadeldud kogutarve – nitrifikatsioonist tingitud tarve (8)

Ainult summaarse oksüdeeritud lämmastiku hulga määramisel võib nitrifikatsioonist tingitud hapnikutarbe lugeda esimeses lähenduses oksüdeeritud lämmastiku hulgaga võrreldes 4,57kordseks.

Süsiniku oksüdeerimise hapnikutarbe parandatud väärtust võrreldakse seejärel 2. liite kohaselt arvutatud $ThOD_{NH3}$ väärtusega.

▼B

C.5. LAGUNEMINE – BIOKEEMILINE HAPNIKUTARVE

1. MEETOD

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva meetodi abil mõõdetakse tahkete või vedelate orgaaniliste ainete bioloogilist hapnikutarvet (BHT).

Katses leitud andmed kehtivad vees lahustuvate ühendite puhul; siiski võib vähemalt põhimõtteliselt uurida ka lenduvaid ja vees vähelahustuvaid ühendeid.

Meetod on kohaldatav ainult sellistele uuritavatele orgaanilistele katsematerjalidele, mis ei mõju katses kasutatavatel kontsentratsioonidel bakteritele inhibeerivalt. Kui uuritav materjal katsekontsentratsioonil ei lahustu, võib selle hea dispergeerituse saavutamiseks vaja olla erimeetmeid, näiteks ultrahelidispergeerimist.

Madalate biolagunduvuse väärtuste tõlgendamisel ja sobivate katsekontsentratsioonide valikul võivad kasulikud olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

BHT määratletakse kindla koguse aine lahuse ettenähtud tingimustel biokeemiliseks oksüdeerimiseks vajaliku lahustunud hapniku massina.

Tulemused väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

1.3. VÕRDLUSAINED

Soovitatav on kontrollida inokulaadi aktiivsust sobiva võrdlusaine abil.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kindel kogus sobivas hästi aereeritud lahuses lahustatud või dispergeeritud ainet inokuleeritakse mikroorganismidega ja inkubeeritakse pimedas kindlaksmääratud konstantse temperatuuriga ruumis.

BHT määratakse lahustunud hapniku sisalduse vahe järgi katse algul ja lõpul. Katse kestus peab olema vähemalt viis ja mitte rohkem kui 28 päeva.

Paralleelselt tuleb teha testaineta nullproov.

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

BHT määramist ei saa lugeda aine usaldusväärseks biolagunduvuse määramise meetodiks. Meetod sobib kasutamiseks ainult sõelkatsena.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

Ainest valmistatakse lähtelahus või dispersioon, mille BHT sobiks kasutatava meetodiga. Seejärel määratakse mis tahes siseriikliku või rahvusvahelise standardmeetodi abil BHT.

▼B

2. **ANDMED JA HINDAMINE**

Lähtelahuse BHT arvutatakse vastavalt valitud standarditud meetodile ja väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

3. **ARUANDLUS**

Ära tuleb märkida kasutatud meetod.

Bioloogilise hapnikutarbena esitatakse vähemalt kolme nõuetekohase mõõtmise keskmine tulemus.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti aine lisandeid, füüsikalist olekut, mürgisust ja koostist käsitlevad andmed ja märkused.

Kui bioloogilise nitrifikatsiooni pidurdamiseks kasutatakse lisaainet, tuleb see ära märkida.

4. VIITED

Näitlike standardmeetodite nimekiri:

NF T 90 – 103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **LAGUNEMINE – KEEMILINE HAPNIKUTARVE**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva meetodi abil mõõdetakse valitud standarditud, kindlaksmääratud laboritingimustel tahkete või vedelate orgaaniliste ainete keemilist hapnikutarvet (KHT).

Katse tegemisel ja saadud tulemuste tõlgendamisel on kasulik teada aine struktuuri (nt orgaaniline halogeniidsool, orgaaniline Fe^{++} sool, kloororgaaniline ühend).

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Keemiline hapnikutarve iseloomustab aine oksüdeeritavust ja seda väljendatakse kindlaksmääratud laboritingimustel aine oksüdeerimiseks kulunud oksüdeerija kogusele vastava hapniku kogusena.

Tulemused väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi kaliibrimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kindlaksmääratud kogust vees lahustatud või dispergeeritud ainet oksüdeeritakse kahe tunni jooksul tagasijooksuga kuumutamisel kaaliumdikromaadiga kontsentreeritud väävelhappes, hõbesulfaatkatalüsaatori juuresolekul. Dikromaadi jääk määratakse raud(II)ammooniumsulfaadi standardlahusega tiitrimisel.

Kloori sisaldavate ühendite puhul lisatakse kloori segava mõju vähendamiseks elavhõbesulfaati ([1]).

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Rangelt määratlemata määramismeetodi tõttu on KHT „oksüdeeritavuse näitaja” ja on sellisena praktiline meetod orgaanilise aine sisalduse määramiseks.

Katset võib segada kloorisisaldus; KHT määramist võivad segada ka anorgaanilised redutseerijad ja oksüdeerijad.

Mõned tsüklilised ühendid ja paljud lenduvad ained (nt madalamad rasvhapped) ei oksüdeeru selles katses täielikult.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

Ainest valmistatakse lähtelahus või -dispersioon, mille KHT jääb vahemikku 250–600 mg/l.

([1]) Pärast kasutamist tuleb elavhõbedasooli sisaldavad lahused ümber töödelda, et vältida elavhõbeda sattumist looduskeskkonda.

▼B

Märkused

Vähelahustuvate või mittedispergeeruvate ainete puhul võib kaaluda 5 mg KHT-le vastava koguse peenestatud ainet või vedelikku ja viia selle koos veega katseseadmesse.

Sageli ja eriti vähelahustuvate ainete puhul määratakse KHT meetodi ühe variatsiooni kohaselt, st suletud rõhuühtlustajaga süsteemis (H. Kelkenberg, 1975). Selle modifitseeritud meetodi abil saab edukalt uurida ka tavameetodi abil raskesti uuritavaid aineid, nt äädikhapet. Püridiiniga see meetod aga ei toimi. Kui kaaliumdikromaadi kontsentratsioon viiakse viite 1 kohaselt väärtuseni 0,0416 M (0,25 N), võimaldab see 5–10 mg ainet otse sisse kaaluda, mis on vees vähelahustuvate ainete KHT määramisel väga oluline (viide 2).

Muul juhul määratakse KHT seejärel mis tahes siseriikliku või rahvusvahelise standarditud meetodi abil.

2. **ANDMED JA HINDAMINE**

Kolvi sisu KHT arvutatakse valitud standarditud meetodi abil ja väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

3. **ARUANDLUS**

Ära tuleks märkida kasutatud standardmeetod.

Keemilise hapnikutarbena esitatakse vähemalt kolme mõõtmise keskmine tulemus. Registreerida tuleb kõik teadaolevad tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti tulemusi aine lisandeid, füüsikalist olekut ja omadusi käsitlevad andmed ja märkused.

Ära tuleb märkida elavhõbesulfaadi lisamine kloori segava mõju vähendamiseks.

4. **VIITED**

1) Kelkenberg, H., Z. Von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2) Gerike, P The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, 984, vol. 13, 169.

Standardmeetodite näidisloend:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. LAGUNEMINE – ABIOOTILINE LAGUNEMINE: HÜDROLÜÜSI SÕLTUVUS pHst

1. MEETOD

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 111 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Kemikaalid võivad sattuda pinnavette otsese kasutamise, pritsmete edasikandumise, äravoolu, drenaaži, jäätmete kõrvaldamise, tööstus-, olme- või põllumajandusheitvee ja atmosfäärisademetega ning võivad pinnavees muunduda keemiliste (nt hüdrolüüs, oksüdatsioon), fotokeemiliste ja/või mikrobioloogiliste protsesside teel. Käesolevas suunises kirjeldatakse laboratoorset katsemeetodit kemikaalide abiootilise hüdrolüütilise muundumise hindamiseks veesüsteemides pH väärtuste juures, mis esinevad tavaliselt keskkonnas (pH 4–9); meetod põhineb olemasolevatel suunistel (1–7).

Katsetega määratakse kindlaks i) uuritava aine hüdrolüüsi kiirus pH funktsioonina ja ii) hüdrolüüsisaaduste, millega organismid võivad kokku puutuda, koostis või laad ning tekkimis- ja lagunemiskiirus. Selliseid uuringuid võib olla vaja kemikaalide puhul, mida juhitakse otse vette või mis võivad sattuda keskkonda muudel eespool kirjeldatud viisidel.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Vt 2. liidet.

1.3. KATSEMEETODI KASUTUSALA

Meetod on üldiselt kasutatav (märgiseta või märgisega) keemiliste ainete puhul, mille jaoks on olemas piisava täpsuse ja tundlikkusega määramismeetod. Seda saab kasutada vähelenduva või lendumatu ühendi puhul, mis lahustub piisavalt hästi vees. Käesoleva meetodiga ei tuleks uurida kemikaali, mis lendub vesilahusest väga kergesti (nt fumigant, orgaaniline lahusti) ja mida seetõttu ei saa hoida lahuses käesoleva katse tingimustes. Katset võib olla raske teha vees väga vähe lahustuva ainega (8).

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine viiakse pH eri väärtusega (pH 4, 7 ja 9) steriilsetesse vesipuhverlahustesse ja neid inkubeeritakse kontrollitud laboritingimustes pimedas (püsival temperatuuril). Pärast ettenähtud ajavahemike möödumist määratakse puhverlahuses uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste sisaldus. Märgisega (nt ^{14}C) aine puhul on kergem koostada massibilanssi.

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse astmelist lähenemisviisi, mida on näidatud ja selgitatud 1. liites. Iga järgmine aste sõltub eelmise tulemustest.

▼B

1.5. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Hüdrolüüsi kiiruse mõõtmiseks saab kasutada märgiseta või märgisega ainet. Märgisega ainet tuleb hüdrolüüsitee uurimisel ja massibilansi koostamisel üldiselt eelistada; siiski ei pruugi märgisega aine kasutamine olla erijuhtudel tingimata vajalik. Soovitatakse kasutada ^{14}C-märgist, kuid teiste isotoopide, näiteks ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H tarvitamine võib samuti kasulik olla.Märgisega aatom peaks võimaluse korral paiknema molekuli kõige stabiilsema(te)s osa(de)s. Kui uuritav aine sisaldab näiteks ühte tsüklit, peaks märgis olema selles tsüklis; kui uuritav aine sisaldab kaht või enamat tsüklit, võib olla vaja eraldi uuringuid, et hinnata iga märgisega tsükli muundumisi ja saada vajalikku teavet hüdrolüüsisaaduste moodustumise kohta. Uuritava aine puhtus peab olema vähemalt 95 %.

Enne hüdrolüüsikatse tegemist peab olemas olema järgmine teave uuritava aine kohta:

a) lahustuvus vees (katsemeetod A.6);

b) lahustuvus orgaanilistes lahustites;

c) aururõhk (katsemeetod A.4) ja/või Henry konstant;

d) jaotuskoefitsient süsteemis n-oktanool/vesi (katsemeetod A.8);

e) dissotsiatsioonikonstant (pK_a) (OECD suunis 112) (viide 9);

f) otsese ja kaudse fototransformatsiooni kiirus vees (vajaduse korral).

On vaja määramismeetodeid uuritava aine kvantitatiivseks määramiseks ning vajaduse korral hüdrolüüsisaaduste identifitseerimiseks ja kvantitatiivseks määramiseks vesilahuses (vt ka punkt 1.7.2).

1.6. VÕRDLUSAINED

Hüdrolüüsisaaduste kindlakstegemiseks ja kvantitatiivseks määramiseks spektroskoopiliste ja kromatograafiliste meetodite või muude piisavalt tundlike meetodite abil tuleks võimaluse korral kasutada võrdlusaineid.

1.7. KVALITEEDIKRITEERIUMID

1.7.1. **Saagis**

Uuritava aine määramine puhverlahustest või nende ekstraktidest vähemalt kahes paralleelkatses kohe pärast uuritava aine lisamist annab esimese ettekujutuse määramismeetodi ja uuritava aine lisamise korratavusest. Hilisemate katsestaadiumide puhul saab määramissaagised leida vastavate massibilansside alusel (kui kasutatakse märgisega ainet). Määramissaagis peaks nii märgisega kui ka märgiseta kemikaali puhul olema vahemikus 90–110 % (7). Kui tehniliselt on sellist vahemikku raske saavutada, on 70 %line saagis märgiseta kemikaali puhul lubatav, kuid seda tuleb põhjendada.

▼B

1.7.2. **Määramismeetodi korratavus ja tundlikkus**

Uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste kvantitatiivsel määramisel hiljem kasutatava(te) meetodi(te) korratavust saab kontrollida samade puhverlahuste (või nende ekstraktide) paralleelmääramistega siis, kui määramiseks on tekkinud piisav kogus hüdrolüüsisaadusi.

Määramismeetod peab olema piisavalt tundlik, et määrata katseaine kontsentratsioone 10 % või vähem algsest kontsentratsioonist. Vajaduse korral peavad analüüsimeetodid olema ka piisavalt tundlikud, et määrata hüdrolüüsisaaduste kogust, mis moodustab 10 % või enam (ükskõik millisel uuringu hetkel) lisatud kogusest või 25 % või vähem selle saaduse maksimaalsest kontsentratsioonist.

1.7.3. **Hüdrolüüsi kineetiliste andmete usaldusvahemikud**

Kõigi regressioonikoefitsientide, kiiruskonstantide, poolestusaegade ja muude (nt DT50) kineetiliste parameetrite väärtuste jaoks tuleks arvutada ja esitada usaldusvahemikud.

1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.8.1 **Laborivarustus ja seadmed**

Uuring tuleb teha klaasnõudes (nt katseklaasid, väikesed kolvid), vajaduse korral pimedas ja steriilsetes tingimustes, välja arvatud juhul, kui eelnev teave (nagu jaotuskoefitsient n-oktanooli/vee süsteemis) viitab sellele, et uuritav aine võib adsorbeeruda klaasile. Sellistel juhtudel tuleb võib-olla kaaluda muude materjalide (näiteks Teflon®) kasutamist. Klaasile adsorbeerumise mõju saab vähendada ka järgmiste meetoditega:

— katseanuma külge sorbeerunud uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste massi määramine;

— ultrahelivanni kasutamine;

— kõigi klaasnõude pesemine lahustiga iga katseintervalli ajal;

— kaubanduslikku segu jäljendavate toodete kasutamine;

— suurema koguse kaaslahusti kasutamine uuritava aine lisamiseks süsteemile; kui kasutatakse kaaslahustit, peab see olema selline, mis ei hüdrolüüsi uuritavat ainet.

Tavaliselt on vajalikud kontrollitava temperatuuriga vesivann-loksutid või termostateeritavad inkubaatorid eri katselahuste inkubeerimiseks.

Vaja läheb standardset laborivarustust, eriti järgmisi seadmeid:

— pH-meeter;

▼B

— analüüsiseadmed, nagu GC-, HPLC-, TLC-seadmed, kaasa arvatud vajalikud seadmed radioaktiivse märgisega ja märgiseta ainete määramiseks või isotooplahjenduse pöördmeetodi kasutamiseks;

— seadmed identifitseerimise jaoks (nt MS, GC-MS, HPLC-MS, TMR jne);

— vedelik-stsintillatsiooniloendaja;

— jaotuslehtrid vedelik-vedelik-ekstraktsiooni jaoks;

— seadmed lahuste ja ekstraktide kontsentreerimiseks (nt rotaatoraurusti);

— temperatuuri kontrollimise vahend (nt veevann).

Keemiareagentidest läheb vaja näiteks järgmisi:

— analüüsipuhtad orgaanilised lahustid, nagu heksaan, diklorometaan jne;

— stsintillatsioonivedelik;

— puhverlahused (lähemalt vt punktist 1.8.3).

Kõik hüdrolüüsikatsetes kasutatavad klaasnõud, analüütilise puhtusega vesi ja puhverlahused peavad olema steriliseeritud.

1.8.2. **Uuritava aine lisamine**

Uuritav aine tuleb lisada vesilahusena erinevatesse puhverlahustesse (vt 3. liidet). Lahustumise parandamiseks on lubatud kasutada väikest kogust veega segunevat lahustit (nagu atsetonitriil, atsetoon, etanool), kuid lahusti kontsentratsioon ei tohi tavaliselt ületada 1 mahuprotsenti. Kõrgemat lahusti kontsentratsiooni võib kasutada (nt halvasti lahustuva uuritava aine puhul) ainult siis, kui saab näidata, et lahusti ei mõjuta uuritava aine hüdrolüüsi.

Kaubanduslikku segu jäljendava toote kasutamist üldiselt ei soovitata, kuna ei saa välistada, et segu koostisosad mõjutavad hüdrolüüsi. Siiski võib kaubanduslikku segu jäljendava materjali kasutamine olla sobiv lahendus vees halvasti lahustuva või klaasile adsorbeeruva uuritava aine puhul (vt punkti 1.8.1).

Tuleks kasutada ühte uuritava aine kontsentratsiooni; see ei tohiks ületada 0,01 M või poolt küllastuskontsentratsiooni (vt 1. liidet).

▼B

1.8.3. **Puhverlahused**

Hüdrolüüsikatse tuleks sooritada pH väärtuste 4, 7 ja 9 juures. Selleks tuleb puhverlahuste valmistamisel kasutada analüüsipuhtaid kemikaale ja vett. Mõned sobivad puhversüsteemid on esitatud 3. liites. Tuleb märkida, et kasutatav puhversüsteem võib mõjutada hüdrolüüsi kiirust ja sellistel juhtudel tuleb kasutada alternatiivset puhversüsteemi ([1]).

Iga puhverlahuse pH väärtust tuleb kontrollida kalibreeritud pH-meetriga, mille täpsus on vähemalt 0,1 nõutava temperatuuri juures.

1.8.4. **Katsetingimused**

1.8.4.1. *Katsetemperatuur*

Hüdrolüüsikatsed tuleb teha konstantse temperatuuri juures. Ekstrapoleerimise eesmärgil on oluline hoida temperatuuri vahemikus vähemalt ± 0,5 °C.

Kui uuritava aine hüdrolüüsi kohta ei ole midagi teada, tuleks teha eelkatse temperatuuril 50 °C (1. aste). Edasiste astmete kineetilised katsed tuleb teha vähemalt kolmel temperatuuril (kaasa arvatud katse 50 °C juures), välja arvatud juhul, kui 1. astme katses selgub, et uuritav aine on hüdrolüüsi suhtes stabiilne. Soovitatav temperatuurivahemik on 10–70 °C (eelistatavalt tuleks kasutada vähemalt ühte temperatuuri alla 25 °C); see hõlmab standardtemperatuuri 25 °C ja enamikku välitingimustes esinevaid temperatuure.

1.8.4.2. *Valgus ja hapnik*

Kõik hüdrolüüsikatsed tuleb teha, kasutades sobivaid meetodeid fotolüüsi vältimiseks. Tuleb võtta kõik sobivad meetmed hapniku toime vältimiseks (nt barboteerimine heeliumi, lämmastiku või argooniga viie minuti jooksul enne lahuse valmistamist).

1.8.4.3. *Katse kestus*

Eelkatse kestab viis päeva, samal ajal kui kõrgemate astmete katsed tehakse kuni 90 %lise hüdrolüüsini või kestavad 30 päeva, sõltuvalt sellest, kumb aeg on lühem.

1.8.5. **Katse käik**

1.8.5.1. *Eelkatse (1. aste)*

Eelkatse tehakse temperatuuril 50 ± 0,5 °C pH väärtuste 4,0, 7,0 ja 9,0 juures. Kui viie päeva pärast täheldatakse alla 10 %list hüdrolüüsi ($t_{0,5\ 25}$ °C juures > 1 aasta), peetakse uuritavat ainet hüdrolüüsi suhtes stabiilseks ja tavaliselt ei ole täiendavaid katseid vaja. Kui katseaine on teadaolevalt ebastabiilne keskkonna mõistes oluliste temperatuuride juures, ([2]) ei ole eelkatset vaja teha. Analüüsimeetod peab olema piisavalt täpne ja tundlik, et avastada esialgse kontsentratsiooni 10 %list vähenemist.

([1]) Mabey ja Mill soovitavad fosfaatpuhvri asemel kasutada boraat- või atsetaatpuhvreid (11).

([2]) Selline teave võib pärineda muudest allikatest, nagu samalaadse struktuuriga ühendite hüdrolüüsi andmed kirjandusest või muud poolkvantitatiivsed hüdrolüüsi eelkatsed uuritava ainega varasemas väljaarendamisetapis.

▼B

1.8.5.2. *Ebastabiilse aine hüdrolüüs (2. aste)*

Kõrgema astme katse sooritatakse pH väärtustel, mille juures uuritav aine leiti olevat ebastabiilne vastavalt eespool toodud eelkatse määratlusele. Katseaine puhverdatud lahused termostateeritakse valitud temperatuuridel. Et kontrollida, kas tegemist on 1. järgu reaktsiooniga, tuleb iga reaktsioonilahust analüüsida ajavahemike järel, millega saadakse vähemalt kuus eraldi paiknevat andmepunkti uuritava aine 10–90 %lise hüdrolüüsi vahel. Võetakse individuaalsed paralleelsed proovid (vähemalt kaks proovi eraldi reaktsiooninõudest) vähemalt kuuel proovivõtuajal ja nende sisu analüüsitakse (et saada vähemalt kaksteist paralleeliga andmepunkti). Ühe koondproovi kasutamist, millest igal proovivõtuajal võetakse uuritava aine lahuse individuaalsed alikvoodid, peetakse ebapiisavaks, kuna see ei võimalda analüüsida andmete varieeruvust ja võivad tekkida raskused uuritava aine lahuse saastumise tõttu. Kõrgema astme katse lõpus (st 90 %lise hüdrolüüsi juures või 30 päeva möödudes) tuleb näidata, et lahuse steriilsus on säilinud. Kui lagunemist (st muundumist) ei täheldata, ei peeta steriilsuse katseid siiski vajalikuks.

1.8.5.3. *Hüdrolüüsisaaduste kindlakstegemine (3. aste)*

Sobivate määramismeetoditega tuleb kindlaks teha kõik peamised hüdrolüüsisaadused, vähemalt sellised, mis moodustavad üle 10 % kasutatud kogusest.

1.8.5.4. *Mittekohustuslikud katsed*

Kergesti hüdrolüüsuva uuritava aine puhul võivad olla vajalikud lisakatsed muudel pH väärtustel kui 4, 7 ja 9. Näiteks võib füsioloogiaga seotud eesmärkidel olla vajalik teha katse happelisemates tingimustes (nt pH 1,2) füsioloogiliselt olulise temperatuuri (37 ^{o}C) juures.

2. **ANDMED**

Uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste (kui neid on vaja uurida) kogused iga proovivõtuintervalli ning iga pH ja katsetemperatuuri puhul esitatakse, kui see on asjakohane, protsendina esialgsest kasutatud kontsentratsioonist ning vajaduse korral ühikutes mg/l. Kui kasutati märgisega ainet, tuleb lisaks esitada massibilanss protsendina esialgsest kasutatud kontsentratsioonist.

Tuleb koostada graafik uuritava aine kontsentratsiooni logaritmi sõltuvuse kohta ajast. Kõik peamised hüdrolüüsisaadused, vähemalt need, mis moodustavad ≥ 10 % kasutatud kogusest, tuleb kindlaks teha ja esitada nende kontsentratsiooni logaritmid samal viisil graafikul nagu nende lähteainete puhul, et näidata nende tekkimise ja lagunemise kiirusi.

▼B

2.1. ANDMETE TÖÖTLEMINE

Täpsema poolestusaja või DT_{50} väärtuse arvutamiseks tuleb kasutada sobivaid kineetilisi arvutusmudeleid. Poolestusaja ja/või DT_{50} väärtused (koos usalduspiiridega) tuleb arvutada iga pH ja temperatuuri jaoks, näidates ära ka mudeli, mida kasutati reaktsiooni kineetika järgu ja determinatsioonikordaja (r^2) määramisel. Võimaluse korral tuleb need arvutused teha ka hüdrolüüsisaaduste jaoks.

Erinevatel temperatuuridel tehtud kiiruse mõõtmiste puhul tuleb pseudoesimest järku hüdrolüüsi kiiruskonstante (k_{obS}) kirjeldada temperatuuri funktsioonina. Arvutus peaks põhinema nii k_{obs} eraldamisel happekatalüütilise, neutraalse ja alusekatalüütilise hüdrolüüsi kiiruskonstantideks (k_H, $k_{neutral}$, k_{OH}) kui ka Arrheniuse võrrandil:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

kus A_i ja B_i on regressioonikonstandid, mis leitakse sirge algordinaadist ja tõusust, mis on lineaarse regressiooniga pandud läbi ln k_i väärtuse ja kelvinites väljendatud absoluutse temperatuuri (T) pöördväärtusega määratud punktide. Kasutades neid Arrheniuse suhteid happekatalüütilise, neutraalse ja alusekatalüütilise hüdrolüüsi jaoks, saab pseudoesimest järku kiiruskonstandid ja seega poolestusajad välja arvutada teiste temperatuuride jaoks, mille puhul otsene eksperimentaalne kiiruskonstandi määramine pole teostatav (10).

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Enamik hüdrolüüsireaktsioone toimub pseudoesimest järku reaktsioonina ja seetõttu on poolestusajad sõltumatud kontsentratsioonist (vt 2. liites võrrandit 4). See võimaldab tavaliselt 10^{-2} kuni 10^{-3} M juures määratud laboratoorseid tulemusi üle kanda keskkonnatingimustele ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey ja Mill (11) on esitanud rea näiteid selle kohta, et puhtas vees ja looduslikus vees mõõdetud hüdrolüüsi kiirused on eri kemikaalide puhul olnud heas kooskõlas, kui nii pH kui ka temperatuur olid mõõdetud.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuandes tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine:

— tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (milles on näidatud märgise asukoht, kui kasutatakse radioaktiivse märgisega materjali) ja olulised füüsikalis-keemilised omadused (vt punkti 1.5);

— uuritava aine puhtus (lisandid);

— märgise puhtus märgisega kemikaali puhul ja molaarne aktiivsus (vajaduse korral).

▼B

— Puhverlahused:

— valmistamise kuupäevad ja üksikasjad;

— kasutatud puhvrid ja vesi;

— puhverlahuste molaarsus ja pH.

Katsetingimused:

— uuringute tegemise kuupäevad;

— uuritava aine kasutatud kogus;

— uuritava aine lisamiseks kasutatud meetod ja lahustid (liik ja kogus);

— inkubeeritud uuritava aine puhverdatud lahuste mahud;

— kasutatud inkubatsioonisüsteemi kirjeldus;

— pH ja temperatuur uuringu jooksul;

— proovivõtuajad;

— ekstraktsioonimeetod(id);

— uuritava aine ja selle hüdrolüüsisaaduste puhverlahuses kindlakstegemise ja nende koguse määramise meetodid;

— paralleelproovide arv.

Tulemused:

— kasutatud määramismeetodite korratavus ja tundlikkus;

— määramissaagised (väärtused (%) õigesti tehtud uuringu jaoks on esitatud punktis 1.7.1);

— paralleelproovide andmed ja keskmised tabelina;

— massibilanss kogu katse ajal ja lõpus (kui kasutatakse märgisega ainet);

— eelkatse tulemused;

— tulemuste arutelu ja tõlgendamine;

— kõik originaalandmed ja -näidud.

Järgmine teave on vajalik ainult siis, kui määratakse hüdrolüüsi kiirust:

— uuritava aine ja vajaduse korral hüdrolüüsisaaduste kontsentratsiooni graafikud sõltuvusena ajast iga pH väärtuse ja temperatuuri juures;

— Arrheniuse võrrandi tulemuste tabelid temperatuuri 20 °C/25 °C jaoks koos pH, kiiruskonstandi [h^{-1} või $päev^{-1}$], poolestusaja või DT_{50} ja temperatuuridega [°C], koos usalduspiiride ja korrelatsioonikordaja (r^2) vms andmetega;

— hüpotees hüdrolüüsitee kohta.

▼B

4. **VIITED**

1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

4) Euroopa Liit (EL) (1995). Komisjoni direktiiv 95/36/EÜ, millega muudetakse nõukogu direktiivi 91/414/EMÜ taimekaitsevahendite turuleviimise kohta; V liide. Säilimine ja toime keskkonnas.

5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

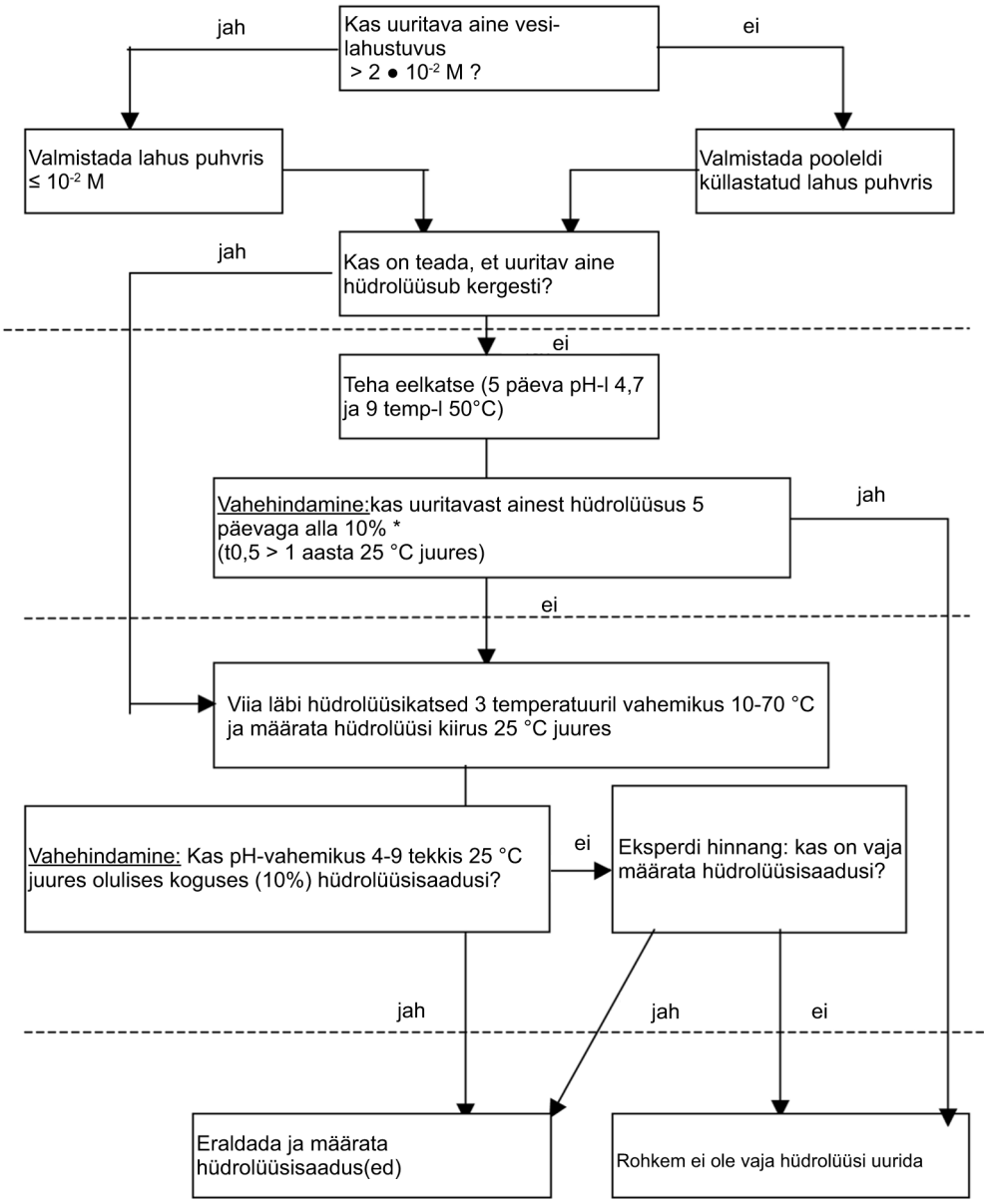
10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383–415.

▼B

1. liide

Hüdrolüüsi uuringu astmeline skeem



* Uuritava aine 10 % line hüdrolüüs 50 ºC juures vastab umbes 30 päevasele poolestusajale, mis omakorda vastab 1 aastale 25 ºC juures.

▼B

2. liide

Mõisted ja mõõtühikud

Kõigil juhtudel tuleb kasutada **rahvusvahelise süsteemi (SI) standardseid mõõtühikuid.**

Uuritav aine – mis tahes aine, kas lähteühend või asjaomased muundumissaadused.

Muundumissaadused – kõik ained, mis tekivad uuritava aine biootiliste või abiootiliste muundumisreaktsioonide tulemusel.

Hüdrolüüsisaadused – kõik ained, mis tekivad uuritava aine hüdrolüütiliste muundumisreaktsioonide tulemusel.

Hüdrolüüs – uuritava aine RX reaktsioon veega, mille tulemusena X-rühm reaktsioonitsentris asendub OH-rühmaga:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Aine RX kontsentratsiooni vähenemise kiirust selles lihtsustatud protsessis kirjeldab järgmine võrrand:

kiirus = $k\ [H_2O]\ [RX]$ teist järku reaktsioon

või

kiirus = $k\ [RX]$ esimest järku reaktsioon,

sõltuvalt kiirust määravast staadiumist. Kuna vett on uuritava ainega võrreldes väga palju, kirjeldab seda tüüpi reaktsiooni tavaliselt pseudoesimest järku reaktsiooni võrrand, milles mõõdetav kiiruskonstant on määratud seosega

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

ja selle saab määrata valemist ([1])

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

kus

t = on aeg

ja C_0, C_t = on RX kontsentratsioonid ajahetkedel 0 ja t.

Selle konstandi ühik on $(aeg)^{-1}$ ja reaktsiooni poolestusaeg (aeg, mis kulub 50 % RX-i reageerimiseks) on määratud seosega

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Poolestusaeg – ($t_{0,5}$) on aeg, mis kulub 50 % uuritava aine hüdrolüüsiks, kui reaktsiooni saab kirjeldada esimest järku kineetikaga; see ei sõltu kontsentratsioonist.

([1]) Kui logaritmitud andmete ja aja seose graafik ei ole sirge (mis vastab esimest järku reaktsioonile), siis ei sobi valem (3) katseaine hüdrolüüsi kiiruskonstandi määramiseks.

▼B

DT_{50} (50 % kadumisaeg) – aeg, mille jooksul uuritava aine kontsentratsioon väheneb 50 % võrra; see on erinev poolestusajast $t_{0,5}$, kui reaktsioon ei järgi esimest järku kineetikat.

k hindamine eri temperatuuridel

Kui on teada kiiruskonstandid kahe temperatuuri juures, saab kiiruskonstandid teiste temperatuuride juures arvutada Arrheniuse valemiga:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ või } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Graafik, mis kujutab ln k sõltuvust 1/T-st, annab sirgjoone tõusuga –E/R,

kus:

k = erinevatel temperatuuridel mõõdetud kiiruskonstant

E = aktivatsioonienergia [kJ/mol]

T = absoluutne temperatuur [K]

R = gaasikonstant [8,314 J/mol.K]

Aktivatsioonienergia arvutatakse regressioonanalüüsi teel järgmisest võrrandist:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kus $T_2 > T_1$.

▼B

3. liide

Puhversüsteemid

A. **CLARK ja LUBS**

CLARKI ja LUBSI puhversegud (*)

Koostis	pH
0,2 N HCl ja 0,2 N KCl 20 °C JUURES	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	2,2
0,1 M kaaliumbiftalaat + 0,1 N HCl 20 °C juures	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,8
0,1 M kaaliumbiftalaat + 0,1 N NaOH 20 °C juures	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,8

(*) Nendes tabelites toodud pH väärtused on arvutatud potentsiaali mõõtmistest, kasutades Sörenseni standardvõrrandeid (1909). Vastavad pH väärtused on 0,04 ühikut suuremad kui tabelis olevad väärtused.

▼B

Koostis	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	6,0

CLARKI ja LUBSI puhversegud (järg)

0,1 M monokaaliumfosfaat + 0,1 N NaOH 20 °C juures	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	8,0
0,1 M $H_3BO_3$0,1 M KCl-s + 0,1 N NaOH 20 °C juures	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF ja VLEESCHHOUWER**

KOLTHOFFI ja VLEESCHHOUWERI tsitraatpuhvrid

Koostis	pH
0,1 M monokaaliumtsitraat ja 0,1 N HCl 18 °C juures (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,6
0,1 M monokaaliumtsitraat ja 0,1 N NaOH 18 °C juures (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	6,0

(*) Lisada väike tümooli- või samalaadse aine kristall hallitusseente kasvu ärahoidmiseks.

▼B

C. **SÖRENSEN**

SÖRENSENI boraadisegud

Koostis		Sörensen 18 °C	Walbum, pH temperatuuril:		
ml booraksit	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M booraks + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M booraks + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

SÖRENSENI fosfaadisegud

Koostis	pH
0,0667 M monokaaliumfosfaat + 0,0667 M dinaatriumfosfaat 20 °C juures	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. **TOKSILISUS VIHMAUSSIDELE**

TEHISMULLA KATSE

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Selles laboratoorses katses lisatakse uuritav aine tehismullale, milles 14 päeva jooksul usse hoitakse. Pärast seda perioodi (ja valikuliselt seitsme päeva pärast) uuritakse katseaine letaalset mõju vihmaussidele. Katse annab suhteliselt kiire meetodi naha ja seedekulgla kaudu omastatavate kemikaalide mõju skriinimiseks vihmaussidel.

1.2. DEFINITSIOON JA ÜHIK

LC_{50} – aine kontsentratsioon, mis arvestuslikult tapab uuringuperioodil 50 % katseloomadest.

1.3. VÕRDLUSAINE

Võrdlusainet kasutatakse perioodiliselt kui vahendit, mis näitab, et katse süsteemi tundlikkus pole oluliselt muutunud.

Võrdlusainena soovitatakse kasutada analüütilise klassi kloroatsetamiidi.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Muld on varieeruv keskkond, seepärast kasutatakse selles katses hoolikalt määratletud tehislikku liivsavi mulda. Täiskasvanud vihmausse liigist *Eisenia foetida* (vt märkust liites) hoitakse kindlas tehismullas, mida on töödeldud uuritava aine erinevate kontsentratsioonidega. Konteinerite sisu puistatakse kandikule laiali 14 päeva (ja valikuliselt seitse päeva) pärast katse algust ning loendatakse iga kontsentratsiooni juures ellujäänud vihmaussid.

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Katse on planeeritud katsesubstraadi ja organismi osas võimalikult hästi korratavana (reprodutseeritavana). Suremus kontrollis ei tohi katse lõpuks olla kõrgem kui 10 %, vastasel juhul on katse kehtetu.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. *Materjalid*

1.6.1.1. K a t s e s u b s t r a a t

Katse põhisubstraadina kasutatakse kindla koostisega tehismulda.

a) Põhisubstraat (protsendid on antud kuivkaalu kohta)

— 10 % *Sphagnu m*'i turvast (pH võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0 ning ilma nähtavate taimejäänusteta, ühtlaselt peenestunud);

▼B

— 20 % kaoliniitsavi, milles võiks olla üle 50 % kaoliniiti;

— umbes 69 % tööstuslikku kvartsiliiva (ülekaalus oleva peene liiva osakestest üle 50 % on suurusega 0,05 kuni 0,2 mm). Kui aine vees piisavalt ei dispergeeru, tuleb jätta 10 g iga katseanuma jaoks saadavale, et see hiljem katseainega segada;

— lisatakse umbes 1 % keemiliselt puhast peenestatud kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$), et pH oleks 6,0 ± 0,5.

b) Katsesubstraat

Katsesubstraat sisaldab põhisubstraati, katseainet ja deioniseeritud vett.

Veesisaldus on 25–42 % põhisubstraadi kuivkaalust. Substraadi veesisaldus määratakse kindlaks proovi kuivatamisel 105 °C juures konstantse kaaluni. Võtmekriteerium on, et tehismuld tuleb niisutada punktini, kus pole seisvat vett. Segamisel tuleb hoolega jälgida, et substraat ja uuritav aine seguneksid ühtlaselt. Ära tuleb näidata uuritava aine substraati viimise viis.

c) Kontrollsubstraat

Kontrollsubstraat koosneb põhisubstraadist ja veest. Kui kasutatakse mõnda lisaainet, peab täiendav kontroll sisaldama sama koguse seda lisaainet.

1.6.1.2. K a t s e a n u m a d

Umbes üheliitrise mahuga klaasanumad (kaetud plastkaante, katete või plastkilega, milles on ventileerimiseks augud), mis on täidetud 500 g kuivale substraadile vastava koguse märja katse- või kontrollsubstraadiga.

1.6.2. *Katsetingimused*

Konteinereid tuleb hoida kliimakambris temperatuuri 20 ± 2 °C pidevas valguses. Valgusintensiivsus peaks olema 400 kuni 800 luksi.

Uuringuperiood on 14 päeva, kuid suremust võib hinnata valikuliselt seitse päeva pärast katse algust.

1.6.3. *Katse käik*

K a t s e k o n t s e n t r a t s i o o n i d

Uuritava aine kontsentratsioonid väljendatakse aine massina põhisubstraadi kuivkaalu kohta (mg/kg).

V a h e m i k u l e i d m i s e k a t s e

Kontsentratsioonide vahemikku, mis põhjustab 0–100 %lise surevuse, võib määrata vahemiku leidmise katsega. Nii saadakse informatsiooni kontsentratsioonide vahemiku kohta, mida tuleb kasutada lõplikus katses.

▼B

Ainet tuleks uurida järgnevate kontsentratsioonide juures: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg ainet/kg uuritava substraati (kuivkaalus) kohta.

Kui tehakse täielik lõplik katse, piisab vahemiku leidmiseks ühest uuringuseeriast iga kontsentratsiooni kohta ja ühest uuringuseeriast töötlemata kontrolli kohta, igas seerias kümme vihmaussi.

Lõplik katse

Vahemiku leidmiseks tehtud uuringu tulemusi kasutatakse vähemalt viie geomeetrilises reas oleva kontsentratsiooni valimiseks, mis katavad surevuse vahemiku 0–100 % ja erinevad konstantse faktori poolest, mis ei ole suurem kui 1,8.

Uuringud, mis kasutavad neid kontsentratsiooni seeriaid, peaks võimaldama LC_{50} väärtust ja selle usaldatavuse piire hinnata nii täpselt kui võimalik.

Lõpliku katse puhul kasutatakse vähemalt nelja uuringukomplekti iga kontsentratsiooni kohta ja nelja töötlemata kontrolli, igas kümme ussi. Nende korduskomplektide tulemused esitatakse keskmise ja standardhälbe kujul.

Kui kaks järjestikust kontsentratsiooni suhtega 1,8 annavad ainult 0 % ja 100 % surevuse, siis need kaks väärtust on piisavad näitamaks vahemikku, kuhu LC_{50} langeb.

Katse põhisubstraadi ja uuritava aine segu

Kui vähegi võimalik, tuleks katsesubstraat valmistada ilma igasuguse lisaaineta, v.a vesi. Vahetult enne uuringu algust segatakse uuritavast ainest deioniseeritud vette või muusse lahustisse tehtud emulsioon või dispersioon uuringu põhisubstraadiga või pritsitakse ühtlaselt selle peale peene kromatograafilise või samalaadse pihustiga.

Vees lahustumatu katseaine võib lahustada võimalikult väikeses sobiva orgaanilise lahusti koguses (näiteks heksaan, atsetoon või kloroform).

Uuritava aine lahustamiseks, dispergeerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada ainult kergesti lagunevaid aineid. Uuritavat substraati tuleb enne kasutamist aereerida. Aurustunud vesi tuleb samas koguses asendada. Kontroll peab sisaldama sama koguse iga lisaainet.

Kui uuritav aine pole orgaanilises lahustis lahustatav, dispergeeritav või emulgeeritav, segatakse 10 g peeneteralise kvartsliiva ja 500 g kuivkaalus tehismulla töötlemiseks vajaliku katseaine segu 490 g kuiva katsesubstraadiga.

Iga katsekomplekti jaoks pannakse igasse klaasanumasse 500 g kuivkaalus substraadiga ekvivalentne kogus niisket substraati ning uuritava substraadi pinnale 10 vihmaussi, keda on eelnevalt 24 tunni jooksul hoitud samasuguses niiskes põhisubstraadis, siis kiirelt pestud ja enne kasutamist filterpaberil üleliigsest veest kuivatatud.

▼B

Konteinerid kaetakse perforeeritud plastkaante, katete või kilega, vältimaks substraadi kuivamist, ning hoitakse 14 päeva katsetingimustes.

Hindamised tuleb teha 14 päeva (valikuliselt seitse päeva) pärast katse üles seadmist. Substraat laotatakse klaasist või roostevabast terasest tehtud alusele. Vihmaussid vaadatakse üle ja loetakse kokku ellujäänud vihmaussid. Vihmaussid tunnistatakse surnuks, kui nad ei vasta keha eesosa õrnale mehhaanilisele stimuleerimisele.

Kui ülevaatus tehakse seitsmendal päeval, täidetakse konteiner uuesti substraadiga ja ellujäänud vihmaussid pannakse sama katsesubstraadi pinnale tagasi.

1.6.4. *Katseorganismid*

Katseorganismideks peavad olema täiskasvanud *Eisenia foetida* eksemplarid (vt märkust liites) (vähemalt kahe kuu vanused, klitellumiga) kaaluga 300 kuni 600 mg (kasvatamise meetodeid vt liitest).

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE JA HINDAMINE

Uuritud aine kontsentratsioonid esitatakse vastavate surnud vihmaussi protsentide suhtes.

Kui andmed on küllaldased, määratakse LC_{50} väärtus ja usalduspiirid ($p = 0,05$) standardmeetodite abil (Litchfield ja Wilcoxon, 1949, ekvivalentne meetod). LC_{50} esitatakse kui testaine (mg) uuritava substraadi (kg) kohta (kuivkaalus).

Neil juhtudel, kui kontsentratsioonikõvera tõus on liiga järsk LC_{50} arvutamise võimaldamiseks, piisab selle väärtuse graafilisest hindamisest.

Kui kaks järjestikust kontsentratsiooni vahega 1,8 annavad ainult 0 % ja 100 % surevuse, piisab neist kahest väärtusest selle vahemiku näitamiseks, kuhu LC_{50} jääb.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmist teavet:

— kinnitus, et katse on tehtud vastavalt ülalmainitud kvaliteedikriteeriumidele;

— tehtud katse (vahemiku leidmise uuring ja/või lõplik katse);

— katsetingimuste täpne kirjeldus või kinnitus, et katse on tehtud kooskõlas meetodiga; kõik kõrvalekalded tuleb loetleda;

— täpne uuritava aine ja põhisubstraadi segamise kirjeldus;

— katseorganisme puudutav informatsioon (liik, vanus, keskmine kaal ja kaalude vahemik, hoidmise ja paljundamise tingimused, tarnija);

▼B

— LC_{50} määramiseks kasutatud meetod;

— katse tulemused koos kõigi kasutatud andmetega;

— katseorganismidel täheldatud sümptomite või käitumise muutuste kirjeldus;

— surevus kontrollides;

— LC_{50} või kõrgeim katsetatud ilma surevuseta kontsentratsioon ja madalaim 100 %lise surevusega katsetatud kontsentratsioon 14 päeva (ja valikuliselt seitse päeva) pärast katse alustamist;

— kontsentratsiooni/vastusreaktsiooni kõvera joonistamine;

— võrdlusaine abil saadud tulemused, kas seoses käesoleva katsega või varasematest kvaliteedikontrollidest.

4. **VIITED**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, p. 331.

3) Bouche, M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments./. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

5) Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorsch-lag „Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden”, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Liide

Vihmausside kasvatamine ja hoidmine enne uurimist

Loomade paljundamiseks pannakse 30 kuni 50 täiskasvanud ussi värske substraadiga kasvatamise karpi, kust nad võetakse välja 14 päeva pärast. Neid loomi võib kasutada edaspidiste paljundamiste jaoks. Kookonitest koorunud vihmausse kasutatakse uuringuks, kui nad on täiskasvanud (ettenähtud tingimustes kahe või kolme kuu pärast).

Hoidmise ja paljundamise tingimused

Kliimakamber:	temperatuur 20 ± 2 °C, eelistatavalt pidevas valguses (intensiivsus 400 kuni 800 luksi).
Kasvatamise karbid:	sobivad 10 kuni 20 l mahuga madalad anumad.
Substraat:	*Eisenia foetida*'t võib kasvatada erinevate loomade ekskrementides. Kasvukeskkonnana soovitatakse 50 % turba ja 50 % lehma- või hobusesõnniku segu. Segu pH peaks olema 6 kuni 7 (reguleerida kaltsiumkarbonaadiga) ja ioonjuhtivus madal (väiksem kui 6 mmhos või 0,5 % soola kontsentratsioon). Substraat peab olema niiske, kuid mitte liiga märg. Lisaks ülaltoodud meetodile võib kasutada ka teisi tulemuslikke metoodikaid.

Märkus. Olemas on mitu *Eisenia foetida* rassi, mida mõned taksonomistid on eristanud liikidena (Bouche, 1972). Need on morfoloogiliselt sarnased, välja arvatud *Eisenia foetida foetida,* mille segmendid on tüüpiliselt põikitriipude või –ribadega, ja *Eisenia foetida andrei,* millel need puuduvad ja punane värvus on varieerunud. Võib kasutada teisi liike, kui vajalik metoodika on olemas.

▼B

C.9. **BIODEGRADATSIOON ZAHNI-WELLENSI KATSE**

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev meetod on mõeldud vesilahustuvate mittelenduvate orgaaniliste ainete täieliku biodegradatsiooni hindamiseks staatilises katses, eksponeerituna suhteliselt suurele mikroorganismide kontsentratsioonile.

Võimalik on füüsikalis-keemiline adsorptsioon suspendeeritud kuivainele, mida tuleks arvestada tulemuste interpreteerimisel (vt 3.2).

Uuritavaid aineid kasutatakse kontsentratsioonides, mis vastavad LOS-väärtustele vahemikus 50 kuni 400 mg/l või KHT-väärtustele vahemikus 100 kuni 1 000 mg/l (LOS = lahustunud orgaaniline süsinik, KHT = keemiline hapnikutarve). Nende suhteliselt suurte kontsentratsioonide eeliseks on analüütiline usaldusväärsus. Toksilise toimega ühendid võivad lagunemisprotsessi aeglustada või inhibeerida.

Selle meetodi puhul kasutatakse uuritava aine täieliku bioloogilise lagunemise hindamiseks lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarve mõõtmist.

Samaaegne spetsiifilise analüüsimeetodi rakendamine võib anda võimaluse määrata aine primaarset biolagunemist (eelühendi keemilise struktuuri kadumine).

Meetod on kasutatav ainult nende uuritavate orgaaniliste ainete puhul, mis katses kasutatud kontsentratsiooni juures

— on katsetingimustel veeslahustuvad;

— omavad katsetingimustel ebaolulist aururõhku;

— ei ole bakterite suhtes pärssiva toimega;

— imenduvad katsesüsteemi vaid piiratud ulatuses;

— ei kao katselahusest vahu tekke tulemusena.

Katsetulemuste tõlgendamisel on kasulik teada uuritava materjali põhikomponentide kohta käivat teavet. Seda eelkõige juhtudel, kui tulemused on väga väikesed või alammääralised.

Teave uuritava aine toksilisusest mikroorganismidele on vajalik väikeste tulemuste tõlgendamisel ja sobivate kontsentratsioonide valimisel.

▼B

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Katse lõpuks saavutatud biolagunemise määr on Zahni-Wellensi testis tuntud kui „biolagunemine”:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

kus:

DT = biodegradatsioon (%) ajahetkel T,

C_A = LOS- (või KHT-) väärtused katsesegus kolm tundi pärast katse algust (mg/l) (LOS = lahustunud orgaaniline süsinik, KHT = keemiline hapnikutarve),

C_T = LOS- või KHT-väärtused katsesegus proovi võtmise ajal (mg/l),

C_B = LOS- või KHT-väärtused „tühja” proovi võtmise ajal (mg/l),

C_{BA} = tühja proovi LOS- või KHT-väärtused, mõõdetuna kolm tundi pärast testi algust (mg/l).

Lagunemise ulatus ümardatakse lähima täisarvulise protsendini.

Lagunemise protsent esitatakse kui LOSi (või KHT) eraldamine testitavast ainest.

Erinevus kolme tunni järel mõõdetud väärtuse ja arvutatud või eelistatult mõõdetud algväärtuse vahel võib anda kasulikku informatsiooni aine eliminatsiooni kohta (vt 3.2 „Tulemuste tõlgendamine”).

1.3. VÕRDLUSAINED

Mõnel juhul, kui uuritakse uusi aineid, võivad võrdlusained olla kasulikud, siiski ei saa veel soovitada spetsiifilisi võrdlusaineid.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

Aktiivmuda, mineraalsed toitained ja uuritav materjal (ainuke süsiniku allikas vesilahuses) segatakse kokku ühe-kuni neljaliitrises klaasanumas, mis on varustatud segisti ja aeraatoriga. Segu segatakse ja aereeritakse 20 kuni 25 °C juures üldvalgustatud või pimedas ruumis kuni 28 päeva. Lagunemisprotsessi jälgitakse LOS- (või KHT-) väärtuste määramisel filtreeritud lahuses, mida tehakse iga päev või muude sobivate ajavahemike järel. Kõikide ajavahemike järel mõõdetud elimineeritud LOS- (või KHT-) väärtuste suhet kolme tunni möödumisel saadud näitajaga väljendatakse protsentides biodegradatsioonina. Saadud tulemus näitab degradatsiooni ulatust antud ajavahemikus.

Kui kasutatakse spetsiifilist analüüsimeetodit, saab mõõta biodegradatsioonist tingitud eellasmolekuli kontsentratsiooni muutusi (primaarne biodegradatsioon).

▼B

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Käesoleva katse korduvteostatavus on ringtesti järgi piisav.

Käesoleva meetodi tundlikkuse määrab suures osas põhilahuse varieeruvus ning vähesemal määral lahustunud orgaanilise süsiniku määramise täpsus ja uuritava ühendi sisaldus vedelikus iga tsükli alguses.

1.6. KATSEPROTSEDUURI KIRJELDUS

1.6.1. *Ettevalmistused*

1.6.1.1. R e a g e n d i d

Uuritav vesi: joogivesi, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on < 5 mg/l. Kaltsium- ja magneesiumioonide kontsentratsioon ei tohi koos ületada näitajat 2,7 mmol/l; vastasel juhul on vaja piisav lahjendus deioniseeritud või destilleeritud veega.

Väävelhape, analüüsi reagent (A.R.):	50 g/l
Naatriumihüdroksiidi lahus A.R.:	40 g/l
Mineraalainetega toitelahus: lahustada ühes liitris deioniseeritud vees:	
ammooniumkloriid, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g
naatriumdivesinikfosfaat, $NaH_2PO_4.2H_2O$, A.R.:	33,4 g
kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g
dikaaliumvesinikfosfaat, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g

Segu on nii toitelahuseks kui ka puhversüsteemiks.

1.6.1.2. S e a d m e d

Klaasnõud mahuga üks kuni neli liitrit (näiteks silindrilised anumad).

Segisti klaasist või metallist segajaosaga sobiva varre küljes (segaja peaks pöörlema ligikaudu 5 kuni 10 cm kõrgemalt anuma põhjast). Kasutada võib ka 7 kuni 10 cm pikkuse pulgaga magnetsegajat.

2 kuni 4 mm siseläbimõõduga klaastoru õhu sissejuhtimiseks. Toru avaus peaks olema ligikaudu 1 cm kõrgusel anuma põhjast.

Tsentrifuug (ligikaudu 3 550 g).

pH-meeter.

Lahustunud hapniku mõõtmise seade.

Paberfiltrid.

▼B

Aparatuur membraanfiltreerimiseks.

Membraanfiltrid poori läbimõõduga 0,45 µn. Membraanfiltrid on sobivad, kui on kindel, et nad ei lase läbi süsinikku ega absorbeeri aineid filtratsiooni etapis.

Analüüsivarustus orgaanilise süsiniku sisalduse ja hapnikutarve määramiseks.

1.6.1.3. Inokulaadi valmistamine

Reoveepuhastist pärit aktiivmuda pestakse (korduvalt) tsentrifuugimisel või katsevees setitamisel (vt ülalt).

Aktiivmuda peab olema sobivate omadustega. Sellist muda saadakse õigesti töötavatest reoveepuhastitest. Võimalikult paljude erinevate bakteriliikide ja -tüvede saamiseks võib olla sobivaim meetod erinevatest allikatest pärit inokulaatide kokku segamine (näiteks erinevad reoveepuhastid, mullaekstraktid, jõevesi jne). Segu tuleb töödelda, nagu allpool kirjeldatud.

Aktiivmuda aktiivsuse kontrollimiseks vt allpool „Funktsionaalne kontroll”.

1.6.1.4. Katselahuste valmistamine

Valada anumasse 500 ml katsevett, 2,5 ml/l mineraalainetega toitelahust ja aktiivmuda koguses, mis annab lõpliku segu kuivaine sisalduseks 0,2 kuni 1,0 g/l. Lisada piisavalt uuritava aine põhilahust, et lõpliku segu LOS-kontsentratsioon oleks 50 kuni 400 mg/l. Vastavad KHT-väärtused on 100 kuni 1 000 mg/l. Lisage katsevett kuni üldkoguseks on üks kuni neli liitrit. Valitav lõppkogus oleneb KHT- ja LOS-määramiseks võetud proovide arvust ja analüüsiprotseduurideks vajalikust kogusest.

Normaalsel juhul on piisavaks koguseks kaks liitrit. Paralleelselt iga katseseeriaga hakatakse kasutama vähemalt ühte kontrollnõud (tühi); see sisaldab ainult aktiivmuda ja mineraalainetega toitelahust, mis lahustatakse katseveega teiste anumates olevate lahustega sama koguseni.

1.6.2. *Katse käik*

Katsenõudes olevat lahust segatakse magnetsegajaga või kruvipropelleriga üldvalgustatud või pimedas ruumis temperatuuril 20 kuni 25 °C. Aeratsiooni tehakse suruõhuga, mida puhastatakse vajaduse korral läbi puuvillast filtri või veega täidetud pesupudeli. Muda ei tohi settida ja hapniku kontsentratsioon ei tohi langeda alla 2 mg/l.

pH-väärtust tuleb kontrollida regulaarsete ajavahemike järel (näiteks üks kord päevas) ja kohandada vajaduse korral väärtusele pH 7 kuni 8.

▼B

Aurustumisest tingitud kaod taastatakse vahetult enne proovi võtmist deioniseeritud või destilleeritud veega vastavalt vajalikule kogusele. Soovitatav on enne testi alustamist märkida ära vedelikunivoo kõrgus anumas. Uued märked tehakse pärast iga proovi võtmist (aereerimise ja segamiseta). Esimesed proovid võetakse alati kolm tundi pärast katse alustamist, et kindlaks teha uuritava materjali adsorptsiooni aktiivmuda poolt.

Uuritava aine eliminatsiooni jälgitakse LOS- ja KHT-määramistega iga päev või muude ajavahemike järel. Katse- ja kontrollnõust võetud proovid filtreeritakse läbi hoolikalt pestud paberfiltri. Esimesed 5 ml uuritavat lahusefiltraati visatakse ära. Raskesti filtreeritavad mudaosad eemaldatakse eelnevalt lOminutilise tsentrifuugimise teel. LOS- ja KHT-määramisi tehakse vähemalt kaks korda ühest proovist. Katse kestuseks on kuni 28 päeva.

Märkus. Häguseks jäänud proovid filtreeritakse läbi membraanfiltrite. Membraanfiltrid ei tohi vabastada ega adsorbeerida ühtegi orgaanilist ainet.

Aktiivmuda funktsionaalne kontroll

Paralleelselt katseanumatega kasutatakse teatud kindlat lahust sisaldavat anumat, et kontrollida aktiivmuda funktsionaalsust. Dietüleenglükool on sellisel juhul osutunud kasulikuks kontroll-lahuseks.

Adaptatsioon

Kui analüüse tehakse suhteliselt lühikeste ajavahemike järel (näiteks kord päevas), on võimalik adaptatsiooni selgelt jälgida degradatsiooni kõveralt (vt joonis 2). Seetõttu ei tohiks katset alustada vahetult enne nädalavahetust.

Kui adaptatsioon tekib perioodi lõpus, võib katset pikendada kuni degradatsiooni lõppemiseni.

Märkus. Kui vajatakse täpsemat teavet adapteerunud muda käitumise kohta, võib sama aktiivmuda veel kord panna kokku sama uuritava materjaliga vastavalt järgnevalt kirjeldatud protseduurile:

Lülitada segaja ja aeraator välja ja lasta aktiivmudal settida. Visata ära supernatant, täita anum katseveega kuni kahe liitrini, segada 15 minutit ja lasta jälle settida. Kui supernatant on jälle ära visatud, kasutage järelejäänud muda katse kordamiseks vastavalt eespool olevatele punktidele 1.6.1.4 ja 1.6.2. Aktiivmuda võib setitamise asemel eraldada ka tsentrifuugimise teel.

Adapteerunud muda võib segada värske mudaga kontsentratsioonini 0,2 kuni 1 g kuivainet/l.

▼B

Analüüsi käik

Tavalisel juhul filtreeritakse proovid läbi hoolikalt pestud paberfiltri (pesemiseks kasutada ioniseeritud vett).

Häguseks jäänud proovid filtreeritakse läbi membraanfiltrite (0,45 μm).

LOS-kontsentratsiooni määratakse ühest proovi filtraadist kaks korda (esimesed 5 ml tuleb ära visata) TOC järgi. Kui infiltraati ei ole võimalik analüüsida samal päeval, tuleb seda kuni järgmise päevani säilitada külmkapis. Pikemaajaline säilitamine ei ole soovitatav.

KHT-kontsentratsiooni määratakse proovi filtraatidest KHT-analüüsi meetodil, mida on kirjeldatud näitlikult allpool (2).

2. **ANDMED JA HINDAMINE**

LOS- ja/või KHT-kontsentratsioone määratakse ühest proovist vähemalt kaks korda vastavalt eespool olevale punktile 1.6.2. Degradatsiooni ajahetkel T arvutatakse vastavalt valemile (definitsioonidega) mis on toodud eespool punktis 1.2.

Degradatsiooni ulatus ümardatakse lähima täisarvulise protsendini. Katse lõpus kindlaks tehtud degradatsiooni näitajat esitatakse kui „Biolagundatavus Zahni-Wellensi testi järgi”.

Märkus. Kui täielik degradatsioon saavutatakse enne katseaja lõppemist ja seda tulemust kinnitatakse järgneval päeval, võib katse lõpetada.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Võimaluse korral peaks katsearuanne sisaldama järgmist teavet:

— uuritava aine algkontsentratsioon;

— kogu ülejäänud teave ja kõik katsetulemused, mis puudutavad uuritavat ainet, võrdlusainet (kui kasutati) ja tühja proovi;

— kontsentratsioon kolme tunni pärast;

— biodegradatsiooni kõver koos selgitustega;

— kuupäev ja koht, kust võeti uuritavate organismide proov, adapteerumise kirjeldus, kasutatud kontsentratsioon jne;

— uuringuprotseduuri muutuste teaduslik põhjendus.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

LOS (KHT) vähenemine, mis leiab aset järk-järgult päevade ja nädalate jooksul, viitab uuritava aine biodegradeerumisele.

▼B

Mõnikord võib olulist rolli mängida füüsikalis-keemiline adsorptsioon. See on näidatud juhul, kui esineb täielik või osaline lisatud LOS-eliminatsioon alguses (esimese kolme tunni jooksul) ning erinevused kontrolli ja katse supernatandi vahel jäävad oodatust väiksemateks.

Kui biodegradatsiooni (või osalise biodegradatsiooni) ja adsorptsiooni tuleb eristada, on vajalikud täiendavad katsed.

Seda saab teha mitmel erineval viisil, kuid kõige usaldusväärsem on supernatantvedeliku või muda kasutamine inokulaadina baasuuringu raames (eelistatult respiromeetriline uuring).

Selles uuringus tuleks kõrgeid, adsorptsiooni teel mitte eemaldatavaid LOS (KHT) tulemusi pidada potentsiaalselt biolagundatavateks. Osaline adsorptsiooni teel mitteeemaldamine viitab sellele, et kemikaal allub vähemalt osalisele biodegradatsioonile. LOS-eemaldamise madalate või null-näitajate põhjuseks võib olla mikroorganismide pärssimine uuritava aine poolt ja selle võib vallandada ka muda lõhustamine või kadu, mis tekitab häguse supernatandi. Testi tuleks korrata, kasutades uuritava aine madalamaid kontsentratsioone.

Spetsiifilise analüütilise meetodi või ^{14}C-märgistatud uuritava aine kasutamine võib anda suurema tundlikkuse. ^{14}C testi ühendi kasutamisel $^{14}CO_2$ sedastamine kinnitab biodegradatsiooni teket.

Kui tulemusi antakse ka primaarse biodegradatsiooni kohta, tuleks võimaluse korral anda selgitus keemilise struktuuri muutustele, mis viib uuritava eellasühendi vastusreaktsiooni kadumisele.

Analüütilise meetodi kinnitus tuleb edastada koos vastusega, mis saadi puhta katsekeskkonna kohta.

4. **VIITED**

1) OECD, Paris, 1981, Test *Guideline 302 B,* Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OJ L 251, 19.9.1984, p. 1).

▼B

Liide

HINDAMISE NÄIDE

Orgaaniline ühend:	4-etoksübensoehape
Teoreetiline katsekontsentratsioon:	600 mg/l
Teoreetiline LOS:	390 mg/l
Inokulaat	reoveepuhasti
Kontsentratsioon:	1 g kuivainet/l
Adaptatsiooni tase:	Pole kohandatud
Analüüs:	LOS-määramine
Proovi kogus:	3 ml
Kontrollaine:	Dietüleenglükool
Ühendi toksilisus:	Toksilised toimed puuduvad kontsentratsioonil alla 1 000 mg/l Kasutatud test: ensümaatiline test

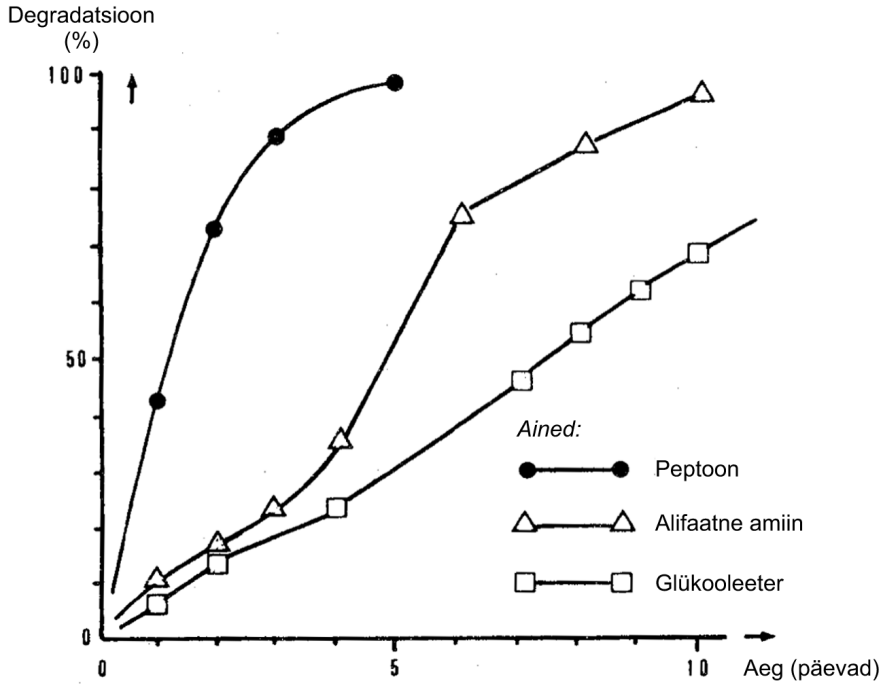
Katseaeg	Kontrollaine				Katseaine		
	Tühi LOS (1) mg/l	LOS (1) mg/l	LOS, puhas mg/l	Degradatsioon %	LOS (1) mg/l	LOS, puhas mg/l	Degradatsioon %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 tundi	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 päev	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 päeva	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 päeva	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 päeva	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 päeva	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 päeva	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 päeva	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 päeva	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Kolme mõõtmise keskmine näitaja.

▼B

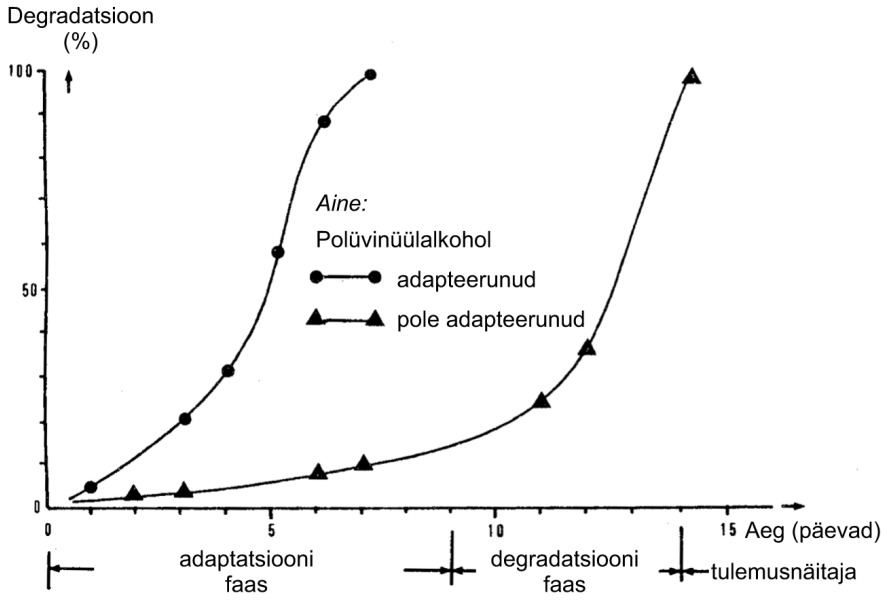
Joonis 1

Biodegradatsioonikõverate näited



Joonis 2

Aktiivmuda adaptatsiooni näited



▼M4

C.10. **REOVEE AEROOBSE TÖÖTLEMISE SIMULATSIOONIKATSE: C.10-A: AKTIIVMUDA – C.10-B: BIOKILED**

C.10-A: Aktiivmuda

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 303 (2001). 1950. aastatel jõuti järeldusele, et hiljuti kasutusele võetud pindaktiivsed ained põhjustasid reoveepuhastites ja jõgedes liigset vahutamist. Neid ei kõrvaldatud täielikult aeroobse töötlemise käigus ja mõnel juhul need takistasid muude orgaaniliste ainete kõrvaldamist. Seepärast alustati mitmeid uuringuid selle kohta, kuidas pindaktiivseid aineid reoveest kõrvaldada ja kas tööstuses toodetud uusi kemikaale on üldse võimalik reoveest puhastada. Selleks kasutati mudelseadmeid, mis esindasid aeroobse bioloogilise reovee puhastamise kahte peamist tüüpi (aktiivmuda ja nõrgfiltri kasutamine). Iga uue kemikaali jaotamine puhastusjaamadesse ja suuremahuliste puhastusjaamade jälgimine ei oleks olnud isegi kohalikul tasandil praktiline ning oleks olnud väga kulukas.

ESIALGSED KAALUTLUSED

Aktiivmuda

2. Aktiivmuda mudelühiku suurus on vahemikus 300 ml kuni ligikaudu 2 000 ml. Mõned neist imiteerisid lähedaselt täiemahulisi puhastusjaamu; neil olid mudasettepaagid, milles settinud muda pumbati tagasi aeratsioonibasseini, teistel ei olnud settimisnõusid, näiteks Swisher (1). Seadme suuruse valimisel on tehtud kompromiss; ühelt poolt peab see olema piisavalt suur, et seda oleks võimalik tulemuslikult mehaaniliselt käitada ja tagada piisav proovide kogus ilma käitamist mõjutamata, kuid teiselt poolt ei tohiks see olla nii suur, et selle rajamiseks oleks vaja liiga palju ruumi ja materjale.

3. Kaks laialdaselt ja rahuldavalt kasutatud seadmete vormi on Husmanni seadmed (2) ja poorse poti seadmed (3, 4), mida kasutati esmakordselt pindaktiivsete ainete uurimisel. Kõnealuseid seadmeid on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis. Rahuldavalt on kasutatud ka muid seadmeid, vt näiteks Eckenfelder (5). Kõnealuse simulatsioonikatse tegemise jaoks vajalike suhteliselt suurte kulude ja jõupingutuste tõttu tehti sellega paralleelselt lihtsamad ja odavamad sõelkatsed, mis on nüüd esitatud käesoleva lisa peatüki C.4 meetodites C4.-A kuni C.4-F (6). Kogemused paljude pindaktiivsete ainete ja muude kemikaalidega on näidanud, et sõelkatses kergesti biolagunevaks osutunud ained lagundati ka simulatsioonikatses. Mõned sõelkatse järgi mittelagundatavaks klassifitseeritud ainetest olid loomuliku biolagundatavuse katsetes lagundatavad (käesoleva lisa peatükid C.12 (7) ja C.19 (8)), kuid ainult mõnda ainet viimati nimetatud rühmast lagundati simulatsioonikatses ning loomuliku biolagundatavuse katsetes mittelagunevaks klassifitseeritud kemikaalid ei lagunenud simulatsioonikatsetes (9, 10, 11).

4. Mõne eesmärgi saavutamiseks piisab ühe käitamistingimuste kogumiga tehtud simulatsioonikatsetest; katsete tulemused väljendatakse lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) või uuritava kemikaali kõrvaldamise protsendiga. Käesolevas katsemeetodis on esitatud sellise katse kirjeldus. Erinevalt käesoleva peatüki varasemast versioonist, kus kirjeldati ainult ühte tüüpi seadet sünteetilise reovee töötlemiseks, mis töötas ühendatud seadmete režiimis ja milles kasutati suhteliselt algelist muda kõrvaldamise meetodit,

▼M4

on käesolevas tekstis esitatud mitmesuguseid variante. On kirjeldatud seadme tüübi, käitamisrežiimi, reovee ja muda kõrvaldamise alternatiive. Käesolev tekst vastab üsna täpselt standardis ISO 11733 (12) kirjeldatule, mida kontrolliti koostamise ajal hoolikalt, kuigi meetodi jaoks ei ole veel laboritevahelist võrdluskatset korraldatud.

5. Muude eesmärkide saavutamiseks peab uuritava kemikaali kontsentratsioon väljavoolus olema täpsemalt teada ja selleks vajatakse ulatuslikumat meetodit. Näiteks muda kõrvaldamise kiirust tuleb iga päev ja kogu katse ajal täpsemalt kontrollida ning seadmeid tuleb käitada mitmel erineval kõrvaldamise kiirusel. Täiemahulise meetodi jaoks tuleks katsed korraldada ka kahel või kolmel erineval temperatuuril: sellist meetodit on kirjeldanud Birch (13, 14) ja selle kokkuvõte on esitatud 6. liites. Praegused teadmised ei ole siiski piisavad, et otsustada, milline kineetilistest mudelitest on kemikaalide biolagunemisele reovee puhastamisel ja veekeskkonnas üldisemalt kohaldatav. Monod' kineetika kohaldamine, mis on näitena esitatud 6. liites, on piiratud kemikaalidega, mille sisaldus on vähemalt 1 mg/l, kuid mõne arvates on isegi see veel põhjendamata. Reoveele iseloomulikke kontsentratsioone täpsemalt peegeldavad katsed on esitatud 7. liites, kuid kõnealused katsed (ja 6. liites esitatud katsed) on esitatud liidetes ning neid ei ole avaldatud eraldi katsemeetoditena.

Filtrid

6. Palju vähem tähelepanu on pööratud nõrgfiltrimudelitele. See võib olla põhjustatud asjaolust, et need on kogukamad ja vähem kompaktsed kui aktiivmudapuhasti mudelid. Gerike *et al.* töötasid välja nõrgfiltrimisseadmed ja käitasid neid ühendatud režiimis (15). Kõnealused filtrid olid suhteliselt suured (kõrgus 2 m; maht 60 l) ja iga filtri jaoks oli vaja 2 l/h reovett. Baumann *et al.* (16) simuleerisid nõrgfiltreid, sisestades 1 m torudesse (mille siseläbimõõt oli 14 mm) nn polüestervillaribad, mida oli 30 minuti vältel immutatud kontsentreeritud aktiivmudaga. Uuritav kemikaal, mis oli ainus süsinikuallikas mineraalsoolade lahuses, sisestati püstsuunalisse torusse ja biolagundamist hinnati lahustunud orgaanilise süsiniku määramisega väljavoolus ning CO_2 mõõtmisega eralduvas gaasis.

7. Biofiltreid simuleeriti teise meetodi abil (15); horisontaalsuuna suhtes väikse nurga all olevate pöörlevate torude sisepindadele viidi reovett (ligikaudu 250 ml/h) koos uuritava kemikaaliga või ilma selleta ning kogutud väljavoolu analüüsiti lahustunud orgaanilise süsiniku ja/või konkreetse uuritava kemikaali määramiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

8. Käesolev meetod on kavandatud selleks, et määrata vees lahustuvate orgaaniliste kemikaalide kõrvaldamist ning esmast ja/või täielikku biolagundamist aeroobsete mikroorganismide poolt pidevalt käitatavas katsesüsteemis, millega simuleeritakse aktiivmuda protsessi. Lihtsasti biolagundatav orgaaniline kasvukeskkond ja orgaaniline uuritav kemikaal on mikroorganismidele energia- ja süsinikuallikateks.

9. Kaks pidevalt käitatavat katseseadet (aktiivmudapuhastid või poorsed potid) töötavad paralleelselt ühesugustel tingimustel, mis valitakse katse eesmärgi kohaselt. Keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg on tavaliselt kuus tundi ja keskmine muda kasutamise aeg (muda retentsiooniaeg) on kuus kuni kümme päeva. Muda kõrvaldatakse ühega kahest meetodist. Uuritavat kemikaali lisatakse ainult ühte seadmetest sissevoolu (orgaaniline kasvukeskkond) kaudu tavaliselt kontsentratsiooniga vahemikus 10–20 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku. Teist seadet kasutatakse kontrollseadmena, et määrata orgaanilise kasvukeskkonna biolagunemist.

▼M4

10. Väljavooludest võetakse sageli proove ja määratakse nendes (eelistatult) lahustunud orgaaniline süsinik või siis keemiline hapnikutarve; selle seadme väljavoolust, kuhu lisatakse uuritavat kemikaali, määratakse spetsiifilise analüüsimeetodiga uuritava kemikaali kontsentratsioon (kui see on nõutav). Katse- ja kontrollseadme väljavoolus määratud lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni või keemilise hapnikutarbe erinevus on eeldatavasti põhjustatud uuritavast kemikaalist või selle orgaanilistest metaboliitidest. Seda erinevust võrreldakse lisatud uuritavast kemikaalist põhjustatud lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooniga või keemilise hapnikutarbega sissevoolus, et määrata uuritava kemikaali kõrvaldamise määr.

11. Biolagunemist võib tavaliselt eristada bioadsorptsioonist nii, et graafikul uuritakse hoolikalt, kuidas kõrvaldamismäär sõltub ajast, ning seda võib tavaliselt kinnitada kiire biolagundatavuse katsega, kasutades selle seadme aklimatiseeritud inokulumi, kuhu lisatakse uuritavat kemikaali.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

12. Tulemuste õigesti tõlgendamiseks on vaja teada uuritava kemikaali puhtust, vees lahustuvust, lenduvus- ja adsorptsiooniomadusi. Tavaliselt ei ole lenduvaid ja lahustumatuid kemikaale võimalik katsetada ilma erimeetmeid võtmata (vt 5. liide). Samuti on vaja teada keemilist struktuuri või vähemalt empiirilist valemit, et arvutada teoreetilisi väärtusi ja/või kontrollida parameetrite mõõdetud väärtusi, näiteks teoreetilist hapnikutarvet (ThOD), lahustunud orgaanilist süsinikku (DOC) ja keemilist hapnikutarvet (COD).

13. Sobivate katsekontsentratsioonide valimiseks võivad vajalikud olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta mikroorganismidele (vt 4. liide) ning vähese biolagundatavuse väärtuste õigeks tõlgendamiseks on sellised andmed hädavajalikud.

KÜNNISVÄÄRTUSED

14. Käesoleva pindaktiivsete ainete esmase biolagundamise simulatsioonikatse (kinnitava katse) esimese rakendamise järel nõutakse konkreetse kemikaali kõrvaldamist rohkem kui 80 % ulatuses, et pindaktiivset ainet võiks lubada turule. Kui 80 % künniseni ei jõuta, võib rakendada kõnealust simulatsioonikatset (kinnitavat katset) ja pindaktiivset ainet võib turustada ainult juhul, kui sellega kõrvaldatakse rohkem kui 90 % konkreetsest kemikaalist. Kemikaalide puhul üldiselt ei teki lubamise/mittelubamise küsimust ja saavutatud kõrvaldamise protsentväärtust võib kasutada tõenäolise keskkonnakontsentratsiooni ligikaudsetes arvutustes, mida kasutatakse kemikaalide põhjustatud ohu hindamiseks. Tulemused järgivad üldjuhul põhimõtet „kõik või mitte midagi”. Puhaste kemikaalide mitmes uuringus leiti, et olulises ulatuses biolagunevatest kemikaalidest rohkem kui kolme neljandiku puhul on lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr > 90 % ning sellistest kemikaalidest rohkem 90 % puhul on see > 80 %.

15. Kõnealuses katses kasutatud kontsentratsioonidel (ligikaudu 10 mg C/l) esineb reovees suhteliselt väheseid kemikaale (näiteks pindaktiivseid aineid). Mõned kemikaalid võivad sellisel kontsentratsioonil inhibeerida ja mõne muu kemikaali kõrvaldamise kineetika võib väikesel kontsentratsioonil olla erisugune. Lagundamist oleks võimalik täpsemalt hinnata, kui kasutada muudetud meetodeid ja uuritava kemikaali realistlikult väikest kontsentratsiooni ning selliselt kogutud andmeid saaks kasutada kineetiliste konstantide arvutamiseks. Vajalikke katsemeetodeid ei ole siiski veel täielikult valideeritud ja biolagundamisreaktsioone kirjeldavad kineetilised mudelid ei ole veel kindlaks tehtud (vt 7. liide).

▼M4

VÕRDLUSKEMIKAALID

16. Katse korraliku tegemise tagamiseks on kasulik kemikaalide uurimise ajal aeg-ajalt katsetada kemikaale, mille käitumine on teada. Sellised kemikaalid on näiteks adipiinhape, 2-fenüülfenool, 1-naftool, difeenhape, 1-naftoehape jne (9, 10, 11).

KATSETULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS

17. Simulatsioonikatsete uuringute kohta on olnud märksa vähem teateid kui kiire biolagundatavuse katsete kohta. 80 % või rohkem lagundatavate uuritavate kemikaalide puhul on (samaaegsete) paralleelproovide reprodutseeritavus hea (10–15 % piires), kuid vähem lagundatavate kemikaalide puhul on hajuvus suurem. Üheksanädalases lagundamiskatses on eri juhtudel registreeritud ka mõne piiripealse kemikaaliga väga erinevaid tulemusi (näiteks 10 %, 90 %).

18. Kahte tüüpi seadmetega saadud tulemustes on leitud vähe erinevusi, kuid mõne kemikaali puhul toimub olmereovee kasutamisel ulatuslikum ja järjepidevam lagunemine kui (OECD) sünteetilise reovee puhul.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Seadmed

Katsesüsteem

19. Ühe uuritava kemikaali katsetamise süsteem koosneb katseseadmest ja kontrollseadmest, kuid vaid spetsiifiliste analüüside tegemisel (esmane biolagundamine) on vaja ainult katseseadet. Mitme katseseadme kohta, milles uuritakse kas üht ja sama kemikaali või erinevaid kemikaale, võib kasutada ainult ühte kontrollseadet. Ühendatud seadmete korral (3. liide) peab igal katseseadmel olema oma kontrollseade. Katsesüsteem võib olla kas aktiivmudapuhasti mudel, Husmanni seade (1. liite joonis 1) või poorne pott (1. liite joonis 2). Mõlemal juhul on sissevoolu ja väljavoolu jaoks vaja piisava suurusega säilitusnõusid ning pumpasid, et doseerida sissevoolu, kas eraldi või segatult uuritava kemikaali lahusega.

20. Iga aktiivmudapuhasti seade koosneb aeratsiooninõust, mille maht on teada, ligikaudu 3 liitrit aktiivmuda, ja separaatorist (teisesest selitist), mille maht on ligikaudu 1,5 liitrit. Mahte võib teatavas ulatuses separaatori kõrguse kohandamisega muuta. Eri suurusega nõude kasutamine on lubatud, kui neid käitatakse võrreldava hüdraulilise koormusega. Kui katseruumi temperatuuri hoidmine soovitud vahemikus ei ole võimalik, soovitatakse kasutada veesärgiga nõusid, mille vee temperatuur on reguleeritav. Aktiivmuda tagasiviimiseks separaatorist aeratsiooninõusse kasutatakse suruõhupumpa või doseerimispumpa, mis töötab kas pidevalt või korrapäraste ajavahemike järel.

21. Poorse poti süsteem koosneb sisemisest poorsest silindrist, mille koonuseline alaosa asub mõnevõrra suuremas sama kujuga nõus, mis on valmistatud vett mitte läbi laskvast plastikmaterjalist. Poorse nõu jaoks on sobiv materjal poorne polüetüleen, mille pooride maksimaalne suurus on 90 µm ja paksus 2 mm. Muda eraldamine töödeldud orgaanilisest kasvukeskkonnast toimub poorse seina diferentseeritud läbimise teel. Väljavool koguneb ringikujulisse alasse, kust see kandub ülevoolamise teel kogumisnõusse. Settimist ei toimu ja muda seega tagasi ei suunata. Kogu süsteemi võib paigutada termostaadiga reguleeritavasse vesivanni. Poorsed potid ummistuvad algetappides ja võivad üle voolata. Sel juhul asendage poorne vooderdis puhtaga: kandke kõigepealt

▼M4

muda potist sifooniga puhtasse ämbrisse ning kõrvaldage ummistunud vooderdis. Pärast mitteläbilaskva välissilindri puhtakspühkimist pange sisse puhas vooderdis ja kandke muda tagasi potti. Ummistunud vooderdise külge jäänud muda tuleb samuti hoolikalt maha kraapida ja tagasi potti kanda. Puhastage ummistunud pott kõigepealt peene veejoaga, et eemaldada külgejäänud muda, ning leotage potti siis lahjas naatriumhüpokloriti lahuses ja seejärel vees ning loputage siis põhjalikult veega.

22. Muda aereerimiseks mõlema süsteemi aeratsiooninõus tuleb kasutada sobivat meetodit, näiteks klaasfilteraeraatoreid (aeratsioonielement) ja suruõhku. Õhku puhastatakse vajaduse korral, suunates selle läbi sobiva filtri ja kasutades vesipuhastust. Läbi süsteemi tuleb suunata piisavas koguses õhku, et säilitada aeroobseid tingimusi ja hoida mudahelbed katse vältel kogu aeg hõljuvas olekus.

Filtrimisseade või tsentrifuug

23. Seade proovide filtrimiseks, milles on sobiva poorisuurusega (ava nominaalläbimõõt 0,45 μm) membraanfiltrid, mis adsorbeerivad lahustuvad orgaanilised kemikaalid ja millest vabaneb võimalikult vähe orgaanilist süsinikku. Kui kasutatakse filtreid, millest vabaneb orgaanilist süsinikku, tuleb filtreid hoolikalt pesta kuuma veega, et eemaldada väljauhutav orgaaniline süsinik. Selle asemel võib kasutada tsentrifuugi, mis tagab 40 000 m/s^2.

Analüüsiseadmed

24. Seadmed, mis on vajalikud järgmise kindlaksmääramiseks:

— lahustunud orgaaniline süsinik, orgaanilise süsiniku kogusisaldus või keemiline hapnikutarve;

— konkreetne kemikaal, kui nõutakse selle määramist;

— hõljuvaine, pH, hapniku kontsentratsioon vees;

— temperatuur, happelisus ja leeliselisus;

— ammoonium, nitrit ja nitraat, kui katse tehakse nitrifikatsiooni tingimustes.

Vesi

25. Kraanivesi, mis sisaldab vähem kui 3 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku. Määrake leeliselisus, kui see ei ole teada.

26. Deioniseeritud vesi, mis sisaldab vähem kui 2 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku.

Orgaaniline kasvukeskkond

27. Orgaanilise kasvukeskkonnana võib kasutada sünteetilist reovett, olmereovett või nende segu. On tõendatud (11, 14), et ainult olmereovee kasutamise puhul saadakse sageli suurem lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsent ning sellest saab kõrvaldada ja biolagundada mõnda kemikaali, mis ei ole OECD sünteetilise reovee kasutamisel biolagundatavad. Ka pidev või korrapärane olmereovee lisamine stabiliseerib sageli aktiivmuda, sh võimaldab üliolulise omadusena head settimist. Seega on soovitatav kasutada olmereovett. Igas uues orgaanilise kasvukeskkonna partiis tuleb mõõta lahustuva orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kontsentratsioon. Orgaanilise kasvukeskkonna happelisus või leeliselisus peaks olema teada. Kui orgaanilise kasvukeskkonna happelisus või leeliselisus on vähene, võib see vajada sobiva puhvri lisamist (naatriumvesinikkarbonaat või kaaliumdivesinikfosfaat), et säilitada katse ajal aeratsiooninõus pH ligikaudu 7,5 ± 0,5. Lisatava puhvri kogus ja selle lisamise aeg tuleb igal eraldi juhul kindlaks määrata. Kui segusid kasutatakse kas pidevalt või aeg-ajalt, tuleb segu lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) hoida ligikaudu püsivana, näiteks veega lahjendamise teel.

▼M4

Sünteetiline reovesi

28. Ühes liitris kraanivees lahustatakse: 160 mg peptooni, 110 mg lihaekstrakti, 30 mg karbamiidi, 28 mg veevaba dikaaliumvesinikfosfaati (K_2HPO_4), 7 mg naatriumkloriidi (NaCl), 4 mg kaltsiumkloriiddihüdraati ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 2 mg magneesiumsulfaatheptahüdraati ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$). See OECD sünteetiline reovesi on näidis ja selle keskmine lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon sissevoolus on ligikaudu 100 mg/l. Alternatiivselt võib kasutada muid koostisi, millel on ligikaudu sama lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon ja mis on pärisreoveega sarnasemad. Kui on vajalik väiksema kontsentratsiooniga sissevool, lahjendage sünteetilist reovett näiteks 1 : 1 kraaniveega, et saada kontsentratsioon ligikaudu 50 mg/l. Kõnealune väiksema kontsentratsiooniga sissevool võimaldab nitrifitseerivatel organismidel paremini kasvada ja seda muutust tuleks kasutada juhul, kui on vajalik uurida nitrifitseerivate reoveepuhastite simuleerimist. Kõnealuse sünteetilise reovee kontsentraadi võib valmistada destilleeritud veega ja säilitada kuni ühe nädala temperatuuril 1 °C. Enne kasutamist lahjendatakse seda kraaniveega. (See kasvukeskkond ei ole rahuldav, näiteks lämmastiku kontsentratsioon on väga suur ja süsinikusisaldus on suhteliselt väike, kuid kasvukeskkonna parandamiseks on soovitatud üksnes lisada puhvrina suuremas koguses fosfaati ja rohkem peptooni).

Olmereovesi

29. Kasutage värskelt settinud reovett, mida kogutakse iga päev peamiselt olmereovett töötlevast veepuhastuskäitisest. Seda tuleks koguda enne esmast settimist esmase settimise paagi ülevoolu kanalist või aktiivmudapuhasti sissevoolust ja see peaks üldiselt olema ilma suurte osakesteta. Seda reovett saab enne kasutamist hoida mitu päeva temperatuuril ligikaudu 4 °C (kuid üldiselt ei tohiks seda hoida üle seitsme päeva), kui tõendatakse, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus (või keemiline hapnikutarve) ei ole hoidmise ajal oluliselt vähenenud (s.o vähem kui 20 %). Süsteemi häirimise vähendamiseks tuleks igas uues partiis viia lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) enne kasutamist sobivale konstantsele väärtusele näiteks kraaniveega lahjendamise teel.

Aktiivmuda

30. Koguge inokulatsiooniks aktiivmuda hästi käitatud reoveepuhasti või peamiselt olmereovee puhastamiseks kasutatava laborisuuruses aktiivmudaseadme aeratsiooninõust.

Uuritava kemikaali põhilahused

31. Kui kemikaal on piisavalt lahustuv, valmistage sobiva kontsentratsiooniga (näiteks 1–5 g/l) põhilahus deioniseeritud vees või sünteetilise reovee mineraalses osas (lahustumatute ja lenduvate kemikaalide korral vt 5. liide). Määrake kindlaks põhilahuse lahustunud orgaaniline süsinik ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus ning korrake mõõtmisi iga uue partii puhul. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku ja orgaanilise süsiniku kogusisalduse erinevus on suurem kui 20 %, kontrollige uuritava kemikaali lahustuvust vees. Määrake põhilahuses lahustunud orgaanilise süsiniku või mõõdetud uuritava kemikaali kontsentratsioon spetsiifilise analüüsi abil ja võrrelge nimiväärtusega, et näha, kas määramise saagis on piisavalt hea (tavaliselt võib eeldada > 90 %). Veenduge (eelkõige dispersiooni korral), kas lahustunud orgaanilist süsinikku saab kasutada analüüsiparameetrina või tuleb kasutada ainult spetsiifilist analüüsimeetodit, millega saab määrata uuritavat kemikaali. Dispersiooni puhul on vaja proovid tsentrifuugida. Iga uue partii puhul määrake lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve või uuritav kemikaal spetsiifilise analüüsimeetodiga.

▼M4

32. Määrake põhilahuse pH. Äärmuslikud väärtused osutavad, et kemikaali lisamine võib mõjutada aktiivmuda pH-d katsesüsteemis. Sel juhul neutraliseerige põhilahus väikse koguse anorgaanilise happe või aluse lisamisega, et pH oleks 7 ± 0,5, kuid vältige uuritava kemikaali sadestamist.

KATSE KÄIK

33. Siin on kirjeldatud aktiivmudapuhasti katset; poorse poti süsteemi puhul tuleb seda mõnevõrra kohandada.

Inokulumi valmistamine

34. Inokuleerige katsesüsteem katse alguses kas aktiivmuda või väikesekontsentratsioonilise mikroorganismide inokulumiga. Hoidke inokulumi toatemperatuuril aereerituna kuni selle kasutamiseni ja kasutage ee ära 24 tunni jooksul. Aktiivmuda kasutamise korral võtke aktiivmuda proov tõhusalt käitatava bioloogilise reoveepuhasti aeratsiooninõust või labori puhastist, milles käideldakse peamiselt olmereovett. Kui simuleeritakse nitrifitseerivaid tingimusi, võtke muda nitrifitseerivast reoveepuhastist. Määrake kindlaks hõljuvaine kontsentratsioon ja vajaduse korral suurendage muda setitamise teel selle kontsentratsiooni, et katsesüsteemi lisatav maht oleks minimaalne. Kuivaine lähtekontsentratsioon peab olema ligikaudu 2,5 g/l.

35. Teisel juhul kasutage inokulumina väljavoolu bioloogilisest olmereovee puhastist koguses 2 ml/l kuni 10 ml/l. Võimalikult paljude eri bakteriliikide saamiseks võib olla kasulik eri allikatest, näiteks pinnaveest, saadud inokulumide lisamine. Sel juhul hakkab aktiivmuda katsesüsteemis arenema ja paljunema.

Orgaanilise kasvukeskkonna doseerimine

36. Hoolitsege, et sisse- ja väljavoolunõud ning sissevoolunõust väljuvad ja väljavoolunõusse sisenevad torud on korralikult puhastatud, et seal katse alguses ja kogu katse vältel ei kasvaks mikroobe. Seadke katsesüsteem üles ruumis, mille temperatuuri saab reguleerida (üldiselt vahemikus 20–25 °C) või kasutage veesärgiga katseseadmeid. Valmistage piisav kogus vajaminevat orgaanilist kasvukeskkonda (punktid 27–29). Täitke kõigepealt aeratsiooninõu ja separaator orgaanilise kasvukeskkonnaga ning lisage inokulum (punktid 34 ja 35). Alustage aereerimist nii, et muda jääks hõljuvasse ja aeroobsesse olekusse, ning alustage sissevooluvee doseerimist ja settinud muda ringlussevõttu. Doseerige hoiunõust orgaanilist kasvukeskkonda katse- ja kontrollseadmete aeratsiooninõudesse (punktid 20, 21) ning koguge vastavad väljavoolud samalaadsetesse kogumisnõudesse. Tavapärase kuuetunnise hüdraulilise retentsiooniaja saavutamiseks pumbatakse orgaanilist kasvukeskkonda juurde kiirusega 0,5 l/h. Selle kiiruse kontrollimiseks mõõtke iga päev doseeritud orgaanilise kasvukeskkonna kogus, märkides üles kasvukeskkonna koguse vähenemise hoiunõudes. Kemikaalide vahelduva vabanemise ja koormuse järsu suurenemise mõju uurimiseks on vaja kasutada muid doseerimisrežiime.

37. Kui orgaaniline kasvukeskkond valmistatakse kasutamiseks rohkem kui ühe päeva jooksul, on vaja see jahutada temperatuurini umbes 4 °C või rakendada muid asjakohaseid säilitusmeetodeid, et vältida mikroobide kasvu ja biolagunemist väljaspool katseseadet (punkt 29). Kui kasutatakse sünteetilist reovett, võib valmistada kontsentreeritud põhilahuse (näiteks tavapärasest kontsentratsioonist kümme korda suurema kontsentratsiooniga, punkt 28) ja seda säilitada ligikaudu 4 °C juures. Selle põhilahuse võib enne kasutamist hoolikalt segada vajaliku koguse kraaniveega; teise võimalusena võib seda ka otse katsenõusse pumbata, pumbates eraldi juurde vajaliku koguse kraanivett.

▼M4

Uuritava kemikaali doseerimine

38. Lisage vajalikus koguses uuritava kemikaali põhilahust (punkt 31) sissevoolu vee nõusse või doseerige seda eraldi pumba abil otse aeratsiooninõusse. Sissevoolu tavaline keskmine kontsentratsioon peaks olema 10–20 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku ja ülempiir ei tohiks olla rohkem kui 50 mg/l. Kui uuritav kemikaal vees hästi ei lahustu või võib avalduda toksilisus, vähendage katsekontsentratsiooni väärtusele 5 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku või veel väiksemale kontsentratsioonile, aga seda ainult juhul, kui on olemas asjakohane spetsiifiline analüüsimeetod ja seda kasutatakse (vees halvasti lahustuvat dispersiooni moodustavat uuritavat kemikaali võib lisada doseerimise erimeetodite abil, vt 5. liide).

39. Alustage uuritava kemikaali lisamist pärast ajavahemikku, mille jooksul süsteem on stabiliseerunud ja kõrvaldab tõhusalt orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilist süsinikku (ligikaudu 80 %). Enne uuritava kemikaali lisamist on tähtis kontrollida, et kõik seadmed töötaksid ühevõrra tõhusalt; kui need ei tööta ühevõrra tõhusalt, on üldiselt kasulik eri mudad kokku segada ja lisada eri seadmetesse uuesti võrdsed kogused muda. Kui kasutatakse aktiivmuda inokulumi (ligikaudu) 2,5 g/l (kuivkaal), võib uuritava kemikaali lisada katse alguses, kuna algusest peale üha suuremate koguste otse lisamine võimaldab aktiivmudal uuritava kemikaaliga paremini kohaneda. Olenemata uuritava kemikaali lisamise viisist, soovitatakse korrapäraste ajavahemike järel mõõta voolukiirust ja/või lahuste mahtu hoiunõu(de)s.

Aktiivmuda käsitlemine

40. Aktiivmuda tahkete osakeste kontsentratsioon stabiliseerub üldiselt katse jooksul vahemikus 1–3 g/l (kuivkaal), olenemata kasutatud inokulumist, kuid sõltuvalt orgaanilise kasvukeskkonna kvaliteedist ja kontsentratsioonist, käitamistingimustest, mudas olevate mikroorganismide laadist ning uuritava kemikaali mõjust.

41. Määrake aeratsiooninõudes hõljuvaine sisaldus vähemalt iga nädal ja kõrvaldage liigne muda, et hoida kontsentratsioon vahemikus 1 g/l kuni 3 g/l (kuivkaal) või hoidke püsivana muda keskmist kasutusaega, üldiselt vahemikus 6–10 päeva. Kui muda retentsiooniajaks valitakse näiteks kaheksa päeva, siis eemaldage iga päev 1/8 aeratsiooninõu aktiivmuda kogusest ja kõrvaldage see. Tehke seda iga päev või eelistatavalt automaatselt vaheldumalt sisselülituva pumba abil. Hõljuvaine kontsentratsiooni püsivana või kitsastes piirides hoidmisega ei säilitata püsivat muda retentsiooniaega, mis on käitamisnäitaja, mis määrab uuritava kemikaali kontsentratsioon väljavoolus.

42. Eemaldage kogu katse vältel vähemalt kord päevas aeratsiooninõu ja separaatori seinte külge jäänud muda, et viia see tagasi suspensiooni. Kontrollige korrapäraselt kõiki torusid ja torustikku ning puhastage neid, et vältida biokile teket. Võtke separaatorist settinud muda aeratsiooninõus ringlusse, eelistatavalt vahelduva pumpamise teel. Poorse poti süsteemis ringlussevõttu ei toimu, kuid veenduge, et olete enne nõus mahu märkimisväärset suurenemist pannud sisse puhtad sisemised potid (punkt 21).

43. Husmanni puhasti seadmetes võib muda halvasti settida ja võivad tekkida mudakaod. Seda on võimalik vältida, kui teha katse- ja kontrolliseadmetes paralleelselt järgmist:

— korrapäraste ajavahemike järel, näiteks iga nädal, võib lisada värsket muda või flokulanti (näiteks igasse nõusse 2 ml $FeCl_3$ lahust kontsentratsiooniga 50 g/l), kuid tuleb veenduda, et $FeCl_3$ ei põhjusta uuritava kemikaali reaktsiooni või sadestumist;

▼M4

— suruõhupumba võib asendada peristaltilise pumbaga, mis võimaldab kasutada sissevooluga ligikaudu võrdväärset muda ringlussevõtu voolu ja võimaldab luua settinud mudas anaeroobse ala (suruõhupumba geomeetria tõttu on tagasisuunatud muda minimaalne voolukiirus ligikaudu 12 korda suurem kui sissevoolu kiirus);

— muda võib pumbata separaatorist aeratsiooninõusse vahelduvalt sisselülituva pumbaga (näiteks 5 minutit iga 2,5 tunni tagant, et võtta muda ringlusse kiirusega 1–1,5 l/h);

— vahutamiskadude vältimiseks võib kasutada minimaalsel kontsentratsioonil mittemürgist vahutamisvastast ainet (näiteks silikoonõli);

— õhku võib separaatoris juhtida läbi muda lühikeste järskude pursetena (näiteks 10 sekundit kord tunnis);

— aeratsiooninõusse võib teatava ajavahemiku järel doseerida orgaanilist kasvukeskkonda (näiteks 3–10 minutit iga tund).

Proovide võtmine ja analüüsimine

44. Korrapäraste ajavahemike järel tuleb aeratsiooninõudes mõõta aktiivmuda lahustunud hapniku kontsentratsiooni, temperatuuri ja pH-d. Tuleb veenduda, et alati on saadaval piisavalt hapnikku (> 2 mg/l) ja et temperatuuri hoitakse nõutavas vahemikus (üldiselt 20–25 °C). Hoidke pH-d vahemikus 7,5 ± 0,5, doseerides aeratsiooninõusse või sissevoolu väikses koguses anorgaanilist alust või hapet või suurendades orgaanilise kasvukeskkonna puhverdusvõimet (vt punkt 27). Nitrifitseerimise käigus tekib hapet, 1 mg N oksüdeerumisel tekib kogus, mis on ligikaudu võrdväärne kogusega 7 mg CO_3^-. Mõõtmiste sagedus oleneb mõõdetavast parameetrist ja süsteemi stabiilsusest ning võib varieeruda ühest korrast päevas kuni ühe korrani nädalas.

45. Kontroll- ja katsenõude sissevoolus tuleb mõõta lahustunud orgaanilist süsinikku või keemilist hapnikutarvet. Katse sissevooluvees tuleb spetsiifilise analüüsiga mõõta uuritava kemikaali kontsentratsiooni või seda tuleb hinnata põhilahuse kontsentratsiooni (punkt 31), kasutatud mahu ja katseseadmesse doseeritud reovee koguse põhjal. Uuritava kemikaali kontsentratsiooni on soovitatav arvutada, et vähendada kontsentratsiooniandmete varieerumist.

46. Võtke kogutud väljavoolust vajalikud proovid (näiteks 24 tunni koondproovid) ja filtrige need läbi membraani, mille poori suurus on 0,45 μm, või tsentrifuugige need 40 000 m/s^2 juures 15 minutit. Kui filtrida on raske, tuleb kasutada tsentrifuugimist. Määrake lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve vähemalt kaks korda, et mõõta täielikku biolagunemist ja (kui seda nõutakse) uuritava kemikaali spetsiifilise analüüsiga esmast biolagunemist.

47. Keemilise hapnikutarbe kasutamine võib põhjustada analüüsiprobleeme väikestel kontsentratsioonidel ja seega soovitatakse seda ainult juhul, kui kasutatakse piisavalt suurt katsekontsentratsiooni (ligikaudu 30 mg/l). Tugevasti adsorbeeruva kemikaali puhul soovitatakse samuti mõõta mudas adsorbeeritud kemikaali, kasutades spetsiifilist uuritava kemikaali analüüsi meetodit.

48. Proovivõtu sagedus oleneb katse eeldatavast kestusest. Soovitatav sagedus on kolm korda nädalas. Kui seadmed töötavad tõhusalt, laske süsteemil pärast uuritava kemikaali lisamist 1–6 nädalat kohaneda, et saavutada kohanemise statsionaarne olek. Platoofaasis (punkt 59), mis kestab tavaliselt kolm nädalat, mõõtke katsetulemuse hindamiseks, eelistatavalt vähemalt 15 kehtivat väärtust. Katse võib lõpetada, kui on jõutud piisava kõrvaldamise määrani (näiteks > 90 %) ja saadud kõnealused 15 väärtust, mis väljendavad kolme nädala jooksul igal tööpäeval tehtud analüüse. Katse ei tohiks pärast uuritava kemikaali lisamist üldiselt kesta üle 12 nädala.

▼M4

49. Kui muda nitrifitseerib ja kui uuritakse kemikaali mõjusid nitrifitseerimisele, tuleb katse- ja kontrollseadmete väljavoolu proovides mõõta vähemalt kord nädalas ammooniumi- ja/või nitriti- ja nitraadisisaldust.

50. Kõik analüüsid ja eelkõige lämmastikusisalduse määramine tuleks teha võimalikult kiiresti. Kui analüüsid tuleb edasi lükata, säilitage proove tihedalt suletud pudelis pimedas ja temperatuuril ligikaudu 4 °C. Kui proove tuleb säilitada kauem kui 48 tundi, siis kasutage säilitamiseks sügavkülmutamist, hapestamist (näiteks 1 liitri kohta 10 ml väävelhappelahuse (400 g/l) lisamisega) või asjakohase mürgise aine lisamist (näiteks 1 liitri kohta 20 ml elavhõbe(II)kloriidi lahuse (10 g/l) lisamisega). Kontrollige, et säilitamise meetod ei mõjutaks analüüsi tulemusi.

Katseseadmete ühendamine

51. Kui kasutatakse ühendamist (3. liide), siis vahetage iga päev sama kogus aktiivmuda (150 ml kuni 1 500 ml 3 liitrit lahust sisaldavate aeratsiooninõude puhul) katseseadme ja selle kontrollseadme aeratsiooninõude vahel. Kui uuritav kemikaal adsorbeerub tugevasti muda külge, siis vahetage ainult separaatorite supernatanti. Mõlemal juhul kasutage katsetulemuste arvutamiseks parandustegurit (punkt 55).

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

52. Arvutage uuritava kemikaali lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent igal mõõtmise ajal järgmise võrrandi abil:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

kus

D_t = lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent ajal t

C_s = uuritava kemikaali põhjustatud lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve sissevoolu vees, eelistatavalt hinnatud põhilahuse järgi (mg/l)

E = katse väljavoolus ajal t mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe näitaja (mg/l)

E_o = kontrollseadme väljavoolus ajal t mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe näitaja (mg/l)

53. Kontrollseadme orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määr on kasulik teave katse ajal aktiivmuda biolagundava aktiivsuse hindamiseks. Arvutage kõrvaldamise protsent järgmise võrrandi alusel:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

kus

D_B = kontrollseadme orgaanilises kasvukeskkonnas lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent ajal t

C_M = orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve kontrollseadme sissevoolu vees (mg/l)

▼M4

Soovi korral võite arvutada orgaanilise kasvukeskkonna ja katseseadmes uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsendi järgmise võrrandi abil:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kus

D_T = katse kogu sissevooluvee lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent

C_T = katse kogu sissevooluvee või põhilahuse alusel arvutatud lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve (mg/l)

54. Kui mõõdetakse uuritava kemikaali kõrvaldamist, arvutage see igal hindamisajal spetsiifilise analüüsi meetodiga järgmise võrrandi abil:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kus

D_{ST} = uuritava kemikaali esmase kõrvaldamise protsent ajal t

S_i = uuritava kemikaali mõõdetud või hinnatud kontsentratsioon katse sissevooluvees (mg/l)

S_e = uuritava kemikaali mõõdetud kontsentratsioon katse väljavooluvees ajal t (mg/l)

55. Kui kasutatakse ühendatud režiimi, siis kompenseerige uuritava kemikaali lahjenemine aeratsiooninõus muda vahetuse tõttu parandusteguri abil (vt 3. liide). Kui kasutati keskmist hüdraulilist retentsiooniaega kuus tundi ja aeratsiooninõus poole aktiivmuda mahu vahetamist, tuleb igapäevaseid määratud kõrvaldamise näitajaid (D_t, punkt 52) parandada, et leida tegelik uuritava kemikaali kõrvaldamise määr D_{tc} järgmise võrrandiga:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Katsetulemuste esitamine

56. Koostage kõrvaldamisprotsendi D_t (või D_{tc}) ja D_{st} (kui see on leitud) ajast sõltuvuse graafik (vt 2. liide). Uuritava kemikaali (kui niisuguse või lahustunud orgaanilise süsinikuna) kõrvaldamise kõvera kuju alusel võib teha järeldusi kõrvaldamisprotsessi kohta.

Adsorptsioon

57. Kui uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr on suur kohe katse algusest peale, siis kõrvaldatakse uuritavat kemikaali tõenäoliselt aktiivmuda tahketesse osakestesse adsorbeerimise teel. Seda on võimalik tõendada adsorbeerunud uuritava kemikaali määramisega spetsiifilise analüüsi abil. Tavaliselt ei jää adsorbeeritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine suureks kogu katse vältel; üldiselt toimub alguses suures koguses kõrvaldamine, mis langeb järk-järgult tasakaaluväärtusele. Kui adsorbeeritav uuritav kemikaal suudab siiski mingil viisil põhjustada mikroobipopulatsiooni aklimatiseerumise, siis suureneb seejärel uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr ja jõuab kõrge platooväärtuseni.

▼M4

Ootefaas

58. Nagu ka staatilistes sõelumiskatsetes, nii vajavad uuritavad kemikaalid enne täieliku biolagundamise toimumist sageli ootefaasi. Ootefaasis toimub lagundavate bakterite aklimatiseerumine või kohanemine ja uuritavat kemikaali peaaegu ei kõrvaldata; seejärel toimub kõnealuste bakterite esialgne kasv. See faas lõpeb ja lagundamisfaasi alguseks peetakse hetke, kui ligikaudu 10 % uuritava kemikaali esialgsest kogusest on kõrvaldatud (võttes arvesse adsorptsiooni, kui see toimub). Ootefaasi pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

Platoofaas

59. Pidevas katses kõrvaldamist näitava kõvera platoofaas on määratletud kui faas, milles lagundamine on maksimaalne. Platoofaas peaks kestma vähemalt kolm nädalat ja selle käigus tuleks mõõta ligikaudu 15 kehtivat näitajat.

Uuritava kemikaali keskmine kõrvaldamise määr

60. Arvutage uuritava kemikaali kõrvaldamise näitaja (D_t) väärtustest platoofaasis keskväärtus. See on uuritava kemikaali kõrvaldamise määr ümardatuna lähima täisarvuni (1 %). Samuti soovitatakse arvutada keskväärtuse 95 % usaldusvahemik.

Orgaanilise kasvukeskkonna kõrvaldamine

61. Koostage kontrollseadme orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamisprotsendi ajast sõltuvuse graafik (D_B). Märkige keskmine kõrvaldamise määr samal viisil kui uuritava kemikaali puhul (punkt 60).

Biolagundamise tunnused

62. Kui uuritav kemikaal ei adsorbeeru märkimisväärselt aktiivmudasse ja kõrvaldamist näitaval kõveral on ootefaasiga, lagundamis- ja platoofaasiga biolagundamist näitava kõvera tavapärane kuju (punktid 58, 59), siis võib kindel olla, et mõõdetud kõrvaldamise on põhjustanud biolagundamine. Kui on toimunud suures koguses esialgne kõrvaldamine, siis ei suuda simulatsioonikatse eristada bioloogilise ja abiootilise kõrvaldamise protsesse. Sellistel juhtudel ja muudel juhtudel, kui biolagundamise suhtes tekivad kahtlused (näiteks kui toimub väljapuhumine (*stripping*)), tuleb analüüsida adsorbeerunud uuritavaid kemikaale või teha täiendavad staatilised biolagundamise katsed täpselt bioloogilisi protsesse näitavate parameetrite alusel. Kõnealused katsed on hapniku sidumise meetodid (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-D, C.4-E ja C.4-F (6)) või katse, milles mõõdetakse süsinikdioksiidi tekkimist (käesoleva lisa peatüki C.4 meetod C.4-C (6)) või ISO *Headspace*-meetod (18), kasutades simulatsioonikatsest eelnevalt kokku puutunud inokulumi. Kui mõõdetud on nii lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist kui ka konkreetse kemikaali kõrvaldamist, siis näitab kõrvaldamisprotsentide oluline erinevus (kui esimene on viimati nimetatust väiksem) orgaaniliste vahesaaduste olemasolu väljavoolus; selliseid vahesaadusi võib olla keerulisem lagundada kui lähtekemikaali.

Katsetulemuste kehtivus

63. Inokulumi tavapärase biolagundamise käitumise kohta on saadud teavet, kui on määratud orgaanilise kasvukeskkonna kõrvaldamise määr (punkt 53) kontrollseadmes. Katset võib pidada kehtivaks, kui lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määr kontrollseadme(te)s on kahe nädala möödudes > 80 % ja ei ole täheldatud ebatavalisi asjaolusid.

▼M4

64. Kui on kasutatud kiirelt biolagundatavat (võrdlus)kemikaali, peaks biolagunemise määr (D_t, punkt 52) olema > 90 %.

65. Kui katse tehakse nitrifitseerivates tingimustes, peaks väljavoolude keskmine kontsentratsioon olema < 1 mg/l ammoniaaklämmastikku ja < 2 mg/l nitritlämmastikku.

66. Kui need kriteeriumid (punktid 63–65) ei ole täidetud, siis korrake katset muust allikast pärit inokulumiga, katsetage võrdluskemikaali ja vaadake läbi kõigi katsete tegemise käik.

Katseprotokoll

67. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav kemikaal:

— tunnusandmed;

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused.

Katsetingimused:

— katsesüsteemi tüüp, mis tahes muudatused lahustumatu või lenduva kemikaali katsetamiseks;

— orgaanilise kasvukeskkonna tüüp;

— tööstusliku reovee osakaal reovees ja selle laad, kui see on teada;

— inokulum, laad ja proovivõtukoht (-kohad), kontsentratsioon ja kõik eeltöötlused;

— uuritava kemikaali põhilahus: lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus; suspensiooni korral selle valmistamise viis; kasutatud katsekontsentratsioon; kui see on väljaspool vahemikku 10–20 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku, siis selle põhjendus; lisamise meetod; esmakordse lisamise kuupäev; kõik muudatused;

— keskmine muda kasutamise aeg ja keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg; muda kõrvaldamise meetod; muda pundumise, kao jne vältimise meetodid;

— kasutatud analüüsimeetodid;

— katsetemperatuur;

— muda pundumisomadused, muda mahuindeks (*sludge volume index*, SVI), muda kontsentratsioon aktiivmudas (*mixed liquor suspended solids*, MLSS);

— kõik kõrvalekalded tavalisest katse käigust ja kõik asjaolud, mis võivad olla mõjutanud tulemusi.

Katsetulemused:

— kõik mõõdetud andmed (lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve, uuritava kemikaali määramine spetsiifilise analüüsimeetodiga, pH, temperatuur, hapniku kontsentratsioon, hõljuvaine, N-kemikaalid (kui see on asjakohane));

— kõik D_t (või D_{tc}), D_B, D_{St} arvutatud väärtused tabelite kujul ja kõrvaldamist näitavad kõverad;

— teave ootefaasi ja platoofaasi, katse kestuse, uuritava kemikaali ja kontrollseadme orgaanilise kasvukeskkonna kõrvaldamise määra kohta koos statistilise teabe ja kinnitustega biolagundatavuse ja katse kehtivuse kohta;

— tulemuste arutelu.

▼M4

KIRJANDUS

1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698–706.

3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.

5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

6) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”.

7) Käesoleva lisa peatükk C.12 „Biodegradatsioon – modifitseeritud SCAS test”.

8) Käesoleva lisa peatükk C.19 „Adsorptsiooniteguri (K_{OC}) kindlaksmääramine mullas ja reoveesettes kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil”.

9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157–173.

10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.

11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113–138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.

14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.

15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.

16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91–98, ISBN 011 751661 9.

18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

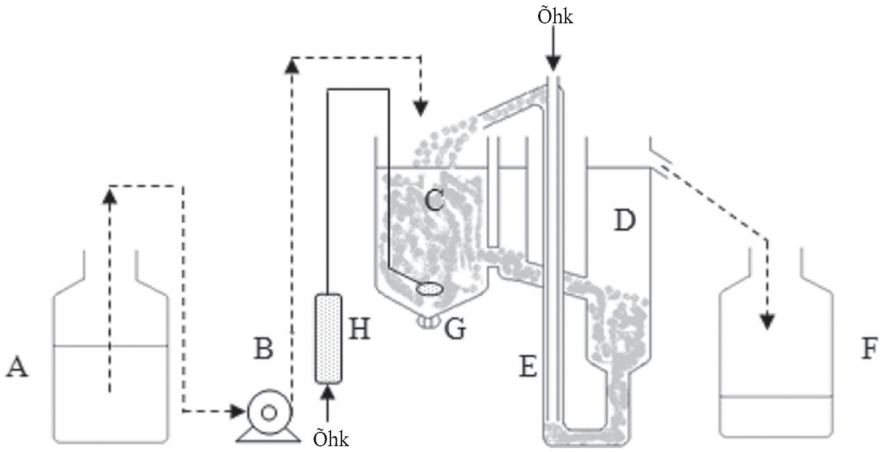
▼**M4**

1. liide

Joonis 1

Seade biolagundatavuse hindamiseks

Husmanni seade



A. Hoiunõu

B. Doseerimispump

C. Aeratsioonikamber (maht 3 l)

D. Settimisnõu

E. Suruõhupump

F. Kogumisnõu

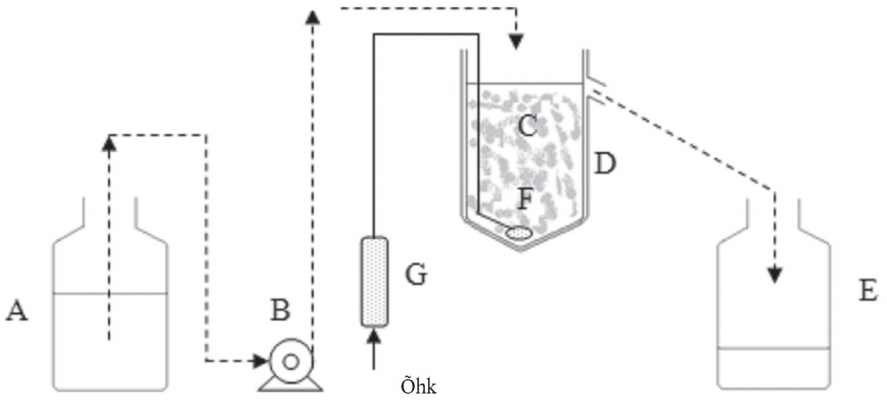
G. Aeraator

H. Õhuvoolumõõtur

Joonis 2

Seade biolagundatavuse hindamiseks

Poorne pott



A. Hoiunõu

B. Doseerimispump

C. Poorne aeratsiooninõu

D. Mitteläbilaskev välimine nõu

E. Kogumisnõu

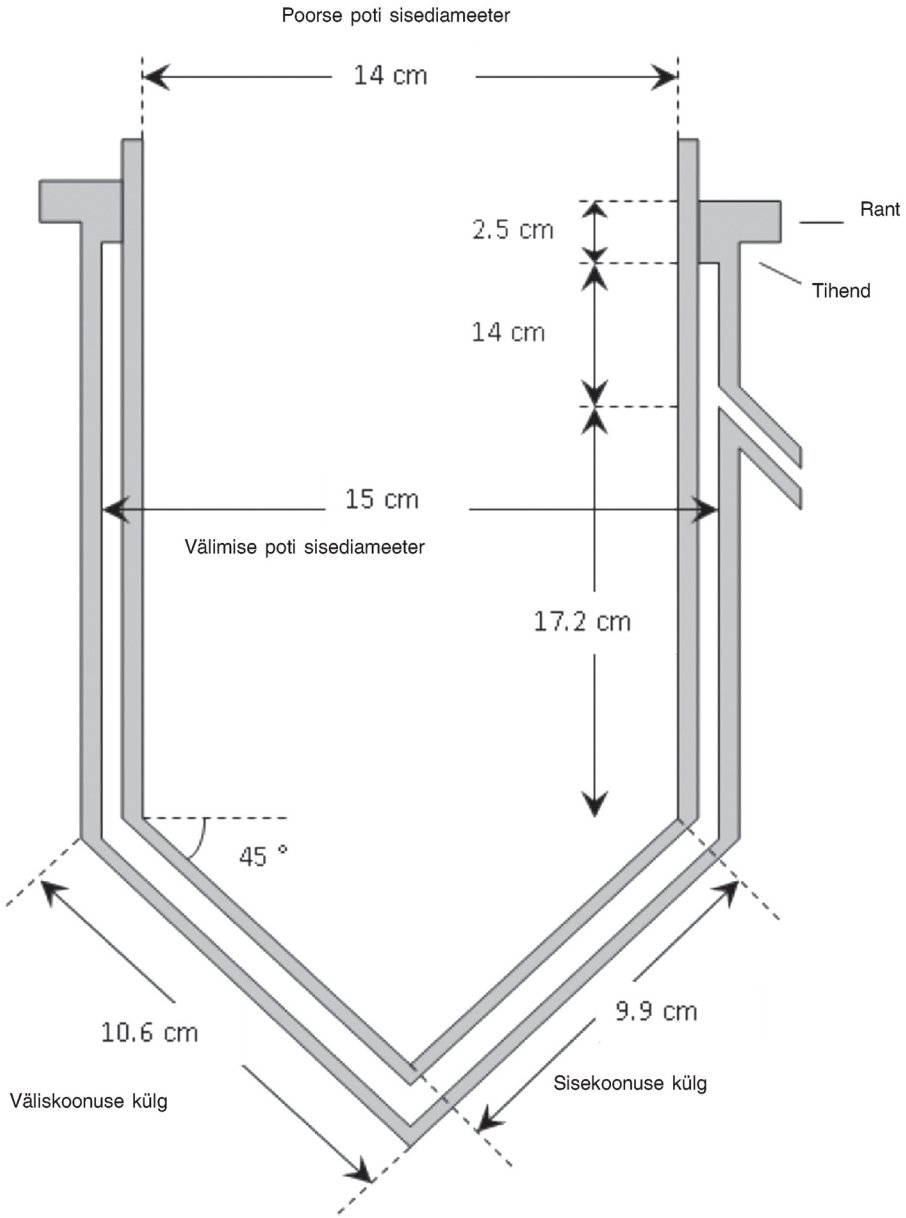
F. Difusiooninõu

G. Õhuvoolumõõtur

▼M4

Joonis 3

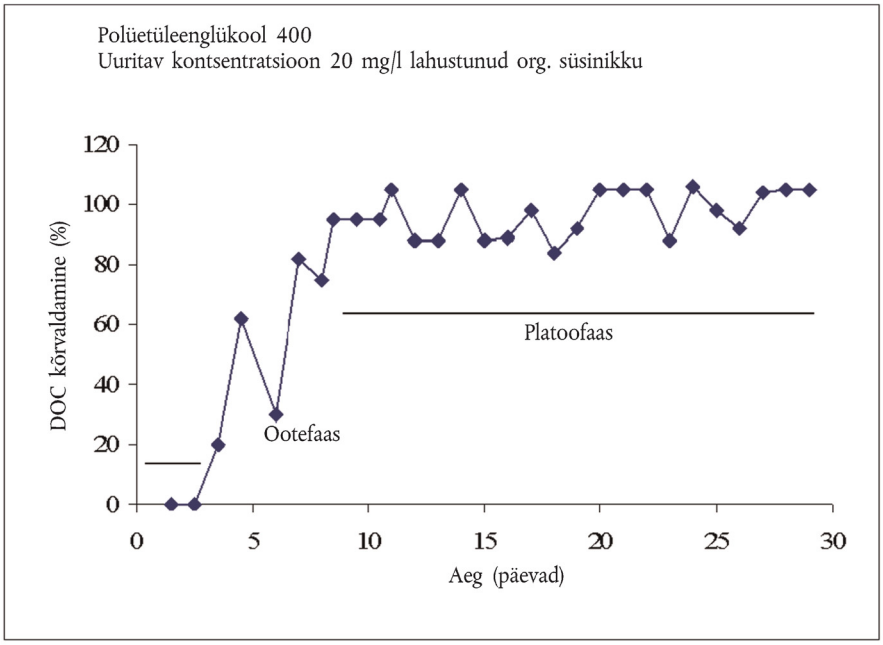
Kolmeliitrise poorse poti aeratsiooninõu andmed



▼**M4**

2. liide

Kõrvaldamiskõvera näide



▼M4

3. liide

[TEADMISEKS]

KATSESEADMETE ÜHENDAMINE

Et proovida võrdsustada reovett ja katsekemikaali käitleva katseseadme ning ainult reovett käitleva kontrollseadme mudade mikroobipopulatsioone, võeti kasutusele mudade igapäevane vahetamine teineteisega (1). See tegevus nimetati ühendamiseks ja selle meetodi kohta kasutatakse nimetust ühendatud seadmed. Ühendamist kasutati esialgu Husmanni aktiivmuda seadmetes, kuid seda on tehtud ka poorse poti seadmetega (2, 3). Ühendamata ja ühendatud seadmete vahel ei leitud Husmanni seadmete ega ka poorse poti seadmete kasutamisel tulemustes märkimisväärseid erinevusi, seega ei anna seadmete ühendamiseks kulutatud aeg ja energia eeliseid.

Mudavahetused võivad jätta olulise kõrvaldamise mulje, kuna osa katsekemikaalist kantakse üle ning katsekemikaali kontsentratsioonid katse- ja kontrollseadmete väljavooludes muutuvad peaaegu võrdseks. Seega tuleb kasutada parandustegureid, mis olenevad vahetatud osa suurusest ja keskmisest hüdraulilisest retentsiooniajast. Arvutuste täpsemad kirjeldused on avaldatud (1).

Lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määra parandatud väärtused saab arvutada järgmise üldvalemi alusel:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

kus

D_{tc} = lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise parandatud protsent

D_t = lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määratud protsent

a = aktiivmuda seadmete mahust vahetatud osa

r = keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg (h)

Kui vahetatakse näiteks pool aeratsiooninõu mahust (a = 0,5) ja keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg on kuus tundi, on parandusteguri võrrand järgmine:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

KIRJANDUS

1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131–1135.

2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113–138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

4. liide

AKTIIVMUDA INHIBITSIOONI HINDAMINE

Protsessi inhibeerimine uuritava kemikaali poolt

1. Kemikaali (või reovett) ei pruugita simulatsioonikatse käigus lagundada või kõrvaldada ning see võib isegi inhibeerida muda mikroorganisme. Muid kemikaale biolagundatakse väikesel kontsentratsioonil, kuid neil on suuremal kontsentratsioonil inhibeeriv mõju (hormees). Inhibeeriv mõju võib olla leitud juba varasemal etapil või selle võib kindlaks teha mürgisuse katsega, kasutades simulatsioonikatses kasutatavaga samalaadset või identset inokulumi (1). Kõnealused meetodid on hapniku tarbimise inhibitsioon (käesoleva lisa peatükk C.11 (2) ja ISO 8192 (3)) või muda organismide kasvu inhibitsioon (ISO 15522 (4)).

2. Simulatsioonikatses ilmneb inhibitsioon katsenõust ja kontrollnõust saadud väljavoolus lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe erinevusena, mis on suurem kui uuritava kemikaalina lisatud lahustunud orgaaniline süsinik. Teisiti öelduna väheneb töötlemise käigus orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku (ja biokeemilise hapnikutarbe, keemilise hapnikutarbe ja/või NH^{+}_{4}) kõrvaldamise protsent uuritava kemikaali olemasolu tõttu. Sellisel juhul tuleks katset korrata, vähendades uuritava kemikaali kontsentratsiooni, kuni jõutakse tasemeni, mille juures inhibitsiooni ei teki, ja kui võib-olla vähendada kontsentratsiooni veel, hakatakse uuritavat kemikaali biolagundama. Kui uuritaval kemikaalil (või reoveel) on siiski protsessile kõigil katsetatud kontsentratsioonidel kahjulik mõju, näitab see seda, et kõnealust kemikaali on keeruline kui mitte võimatu bioloogiliselt töödelda, kuid otstarbekas võib olla korrata katset muust allikast pärit aktiivmudaga ja/või lastes mudal järkjärgulisemalt aklimatiseeruda.

3. Vastupidisel juhul, kui uuritav kemikaal simulatsioonikatses esimesel katsel biokõrvaldatakse, tuleks selle kontsentratsiooni suurendada, kui on vaja teada, kas kemikaalil võiks olla inhibeeriv mõju.

4. Inhibitsiooni astmete määramisel tuleks meeles pidada, et aktiivmuda populatsioon võib muutuda ja seega võivad mikroorganismid aja jooksul hakata inhibeerivat kemikaali taluma.

5. Inhibitsiooni määra arvutamine:

katse- ja kontrollseadmete biokeemilise hapnikutarbe, lahustunud orgaanilise süsiniku, keemilise hapnikutarbe jne üldist kõrvaldamise protsenti R_o saab arvutada järgmise võrrandi alusel:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\%$$

kus:

I = katse- ja kontrollnõu biokeemilise hapnikutarbe, lahustunud orgaanilise süsiniku, keemilise hapnikutarbe jne kontsentratsioon (mg/l) sissevoolus,

E = vastavad kontsentratsioonid (mg/l) väljavoolus.

I ja E tuleb katseseadmetes uuritava kemikaalina lisatud lahustunud orgaanilise süsiniku arvestamiseks parandada, muidu annavad inhibitsiooniprotsendi arvutused vale tulemuse.

▼**M4**

Uuritavast kemikaalist tingitud inhibitsiooni määra saab arvutada järgmise võrrandi alusel:

$$\% \text{ inhibitsiooniprotsent} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

kus:

R_c = kontrollnõudes kõrvaldamise protsent

R_t = katsenõudes kõrvaldamise protsent

KIRJANDUS

1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

2) Käesoleva lisa peatükk C.11 „Biodegradatsioon – aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse”.

3) ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

5. liide

Vees halvasti lahustuvad uuritavad kemikaalid – lenduvad kemikaalid

Vees halvasti lahustuvad kemikaalid

Vees halvasti lahustuvate ja mittelahustuvate kemikaalide kasutamise kohta reovee puhastamist simuleerivates katsetes näib olevat avaldatud vähe töid (1, 2, 3).

Ei ole ühtegi uuritava kemikaali hajutamise meetodit, mis oleks kohaldatav kõigile mittelahustuvatele kemikaalidele. Näib, et kaks neljast standardis ISO 10634 (4) kirjeldatud meetodist on sobivad simulatsioonikatsetes uuritavate kemikaalide hajutamise proovimiseks; need on emulgaatorite ja/või ultrahelienergia kasutamine. Tuleks määrata niiviisi saadava dispersiooni püsivus vähemalt 24 tunni jooksul. Asjakohaselt stabiliseeritud dispersioone, mida hoitakse pidevalt segatavas mahutis (punkt 38), tuleks seejärel doseerida aeratsiooninõusse eraldi olmereoveest (või sünteetilisest reoveest).

Kui dispersioon on stabiilne, siis tuleb uurida, kuidas uuritavat kemikaali saab hajutatud kujul määrata. Lahustunud orgaaniline süsinik tõenäoliselt selleks ei sobi, seega tuleks uuritava kemikaali jaoks leida spetsiifiline analüüsimeetod, mida võiks kasutada väljavoolude, väljavoolu tahkete osakeste ja aktiivmuda puhul. Aktiivmuda protsessi simuleerimisel uuritava kemikaaliga toimuvad reaktsioonid tuleks seejärel määrata vedel- ja tahkes faasis. Seega määrataks massibilanss, et otsustada, kas uuritav kemikaal on biolagundatud. See näitaks siiski ainult esmast biolagunemist. Täieliku biolagunemise tõendamist tuleks proovida, kohaldades kiirele biolagundatavusele respiromeetrilist katset (käesoleva lisa peatüki C.4 (5) meetodid C.4-C, C.4-F või C.4-D), kasutades inokulumina simulatsioonikatses uuritava kemikaaliga kokku puutunud muda.

Lenduvad kemikaalid

Reovee puhastamise simulatsioonide kohaldamine lenduvatele kemikaalide on nii vaieldav kui ka problemaatiline. Nagu ka vees halvasti lahustuvate uuritavate kemikaalide puhul, näib olevat avaldatud vähe artikleid, milles kirjeldatakse lenduvate kemikaalide simulatsioonikatseid. Kasutatakse tavalist tüüpi täieliku segamise seadet ja tihendatud aeratsiooni- ja settenõusid, mõõdetakse ja kontrollitakse voolumõõdikute abil õhuvoolu ning juhitakse väljuv gaas läbi separaatorite, et koguda lenduvat orgaanilist ainet. Mõnikord kasutatakse vaakumpumpa, et juhtida väljuv gaas läbi külmseparaatori või läbipuhumisseparaatori, mis sisaldab gaaskromatograafiliste analüüside jaoks Tenaxit ja silikageeli. Separaatoris leiduva uuritava kemikaali saab määrata analüütiliselt.

Katse tehakse kahes osas. Seadmeid käitatakse kõigepealt ilma mudata, aga sünteetilise reoveega ja uuritava kemikaaliga, mida pumbatakse aeratsiooninõusse. Kogutakse sissevoolu, väljavoolu ja väljutatud gaasi proovid ning paari päeva jooksul analüüsitakse uuritava kemikaali olemasolu neis. Kogutud andmete alusel on võimalik arvutada süsteemist väljapuhutud uuritava kemikaali protsent (R_{vs}).

Seejärel tehakse (mudaga) tavaline bioloogiline katse väljapuhumise uuringuga identsetes tingimustes. Samuti tehakse lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe mõõtmised, et kontrollida seadmete tõhusat toimimist. Katse esimese osa jooksul tehakse aeg-ajalt analüüse, et määrata uuritav kemikaal sissevoolus, väljavoolus ja väljuvas gaasis; pärast aklimatiseerumist tehakse analüüse sagedamini. Statsionaarse oleku andmete põhjal võib arvutada uuritava kemikaali kõigi protsesside (füüsikaline ja bioloogiline) käigus vedelfaasist kõrvaldamise protsendi (R_T) ning samuti süsteemist väljapuhutud osa (R_V).

▼**M4**

Arvutus

a) Mittebioloogilises katses võib arvutada süsteemist väljapuhutud uuritava materjali protsendi (R_{VP}) järgmise võrrandi alusel:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kus

R_{VP} = uuritava kemikaali kõrvaldamine lendumise teel (%);

S_{VP} = separaatorisse kogutud uuritav kemikaal, väljendatuna vedelfaasi võrdväärse kontsentratsioonina (mg/l);

S_{IP} = uuritava kemikaali kontsentratsioon sissevoolus (mg/l).

b) Bioloogilises katses võib arvutada süsteemist väljapuhutud uuritava materjali protsendi (R_V) järgmise võrrandi alusel:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kus

R_V = uuritava kemikaali kõrvaldamine lendumise teel bioloogilises katses (%);

S_V = separaatorisse kogutud uuritav kemikaal bioloogilises katses, väljendatuna sissevooluvedeliku võrdväärse kontsentratsioonina (mg/l);

S_I = uuritava kemikaali kontsentratsioon sissevoolus (mg/l).

c) Bioloogilises katses võib kõikides protsessides kõrvaldatud uuritava kemikaali protsendi (R_T) leida järgmise võrrandi alusel:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kus

S_E = uuritava kemikaali kontsentratsioon (vedelas) väljavoolus (mg/l).

d) Seega on võimalik arvutada 'iolagundamise ja adsorptsiooni teel kõrvaldatud protsenti (R_{BA}) järgmisest võrrandist:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Tuleks teha eraldi katsed, et teha kindlaks, kas uuritavat kemikaali adsorbeeritakse; kui see on nii, siis võib teha täiendava paranduse.

e) Bioloogilisest (R_v) ja mittebioloogilisest (R_{vp}) katsesüsteemist väljapuhutud uuritava kemikaali osakaalu võrdlemine näitab üldist mõju, mis bioloogilisel töötlemisel on uuritava kemikaali heitele atmosfääri.

Näide: benseen

Muda retentsiooniaeg = neli päeva

Sünteetilise reovee retentsiooniaeg = kaheksa tundi

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Seetõttu

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % ja R_{BA} = 85 %.

Eeldati, et benseen ei adsorbeerunud mudale.

KIRJANDUS

1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939–854.

2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4) ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

5) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”.

▼M4

6. liide

Muda retentsiooniaja mõju kemikaalide töödeldavusele

SISSEJUHATUS

1. Peamises tekstiosas kirjeldatud meetod kavandati selleks, et teha kindlaks, kas uuritavaid kemikaale (üldjuhul neid, mis on teadaolevalt iseeneslikult, aga mitte kohe biolagundatavad) on võimalik biolagundada reoveepuhastite piiratud tingimustes. Tulemused väljendatakse kõrvaldamise protsendina ja biolagundamise protsendina. Aktiivmuda seadmete käitamise tingimused ja sissevoolu valik võimaldavad uuritava kemikaali kontsentratsiooni puhul väljavoolus üpris suuri erinevusi. Katsed tehakse ainult ühel muda tahkete osakeste nominaalsel kontsentratsioonil või ühe nominaalse muda retentsiooniajaga ning kirjeldatud muda kõrvaldamise režiimid võivad põhjustada muda retentsiooniaja väärtuse märkimisväärset erinemist katse vältel nii eri päevadel kui ka ühe päeva jooksul.

2. Selle variandi (1, 2) puhul kontrollitakse muda retentsiooniaega palju kitsamates piirides iga 24-tunnise ajavahemiku vältel (täpselt nagu suure ulatuse puhul), mille tulemusel saadakse püsivam kontsentratsioon väljavooludes. Soovitatakse kasutada olmereovett, kuna see annab kõrvaldamise püsivama ja suurema osakaalu. Samuti uuritakse mitme muda retentsiooniaja väärtuse mõju ning üksikasjalikumas uuringus võidakse määrata väljavoolu kontsentratsiooni sõltuvus temperatuurist.

3. Seni ei ole ühist arusaama selle kohta, millised kineetilised mudelid kirjeldavad kemikaali lagunemist reovee puhastamisel teatavatel tingimustel. Kogutud andmete kirjeldamiseks valiti bakterite kasvu ja substraadi kasutamise Monod' mudel (1, 2), kuna meetodit oli kavas kasutada ainult suurtes kogustes toodetavate kemikaalide puhul, mille kontsentratsioon reovees on üle 1 mg/l. Lihtsustatud mudeli ja tehtud eelduste õigsust kontrolliti erineva esmase biolagundatavusega alkoholetoksülaatide seeria abil (2, 3).

Märkus. Selles meetodi variandis on lähedaselt järgitud suurt osa käesoleva katsemeetodi C.10-A tekstist ning allpool on esitatud ainud need üksikasjad, mis on erinevad.

KATSE PÕHIMÕTE

4. Aktiivmuda poorse poti seadmeid, mis on projekteeritud selleks, et võimaldada (peaaegu) pidevat vedela segu kõrvaldamist ja muda retentsiooniaja (SRT või θ_s) väga täpset reguleerimist, kasutatakse ühendamata režiimis mitme muda retentsiooniajaga ning soovi korral mitmel temperatuuril. Retentsiooniaeg on tavaliselt vahemikus 2–10 päeva ja temperatuur on 5–20 °C. Reovett (eelistatavalt olmereovett) ja uuritava kemikaali lahust doseeritakse seadmetesse eraldi sellise kiirusega, et saavutada nõutav reovee retentsiooniaeg (3–6 tundi) ja uuritava kemikaali nõutav kontsentratsioon sissevoolus. Kontrollseadmeid, kuhu uuritavat kemikaali ei lisata, käitatakse samal ajal võrdlusandmete saamiseks.

5. Võib kasutada muud tüüpi seadmeid, kuid tuleks olla väga hoolikas, et tagada muda retentsiooniaja hea reguleerimine. Näiteks settenõuga puhasti kasutamisel võib olla vaja võtta arvesse puhasti väljavoolu kaudu toimuvat tahkete osakeste kadu. Lisaks tuleks võtta erilisi ettevaatusabinõusid, et vältida vigu, mida põhjustab muda koguse varieerumine settenõus.

▼M4

6. Seadmeid käitatakse iga valitud tingimuste komplektiga ja pärast tasakaaluoleku saavutamist määratakse uuritava kemikaali väljavoolude keskmised statsionaarse oleku kontsentratsioonid ning soovi korral lahustunud orgaanilise süsiniku näitajad ligikaudu kolmenädalase ajavahemiku vältel. Lisaks uuritava kemikaali ja, soovi korral, lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsendi hindamisele tuleb graafiliselt esitada väljavoolu kontsentratsiooni sõltuvus puhasti kasutustingimustest. Selle alusel saab arvutada esialgsed kineetilised konstandid ja ennustada tingimusi, milles võib töödelda uuritavat kemikaali.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

7. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 12 ja 13.

KÜNNISVÄÄRTUSED

8. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 14 ja 15.

VÕRDLUSALUSENA KASUTATAV UURITAV KEMIKAAL

9. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 16.

KATSETULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS

10. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 17 ja 18.

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

11. Sobiv seade on muudetud poorse poti süsteem (liide 6.1). See koosneb sisemisest nõust (või vooderdisest), mis on valmistatud poorsest polüpropüleenist; vooderdise paksus on 3,2 mm ja poori suurus ligikaudu 90 μm. Nende omavaheline ühendus põkk-keevitatakse. (Nii saadakse töökindlam seade kui käesoleva peatüki C.10-A punktis 21 kirjeldatud seade). Vooderdis on paigutatud vett mitte läbi laskvasse polüetüleenist välisnõusse, mis koosneb kahest osast: ringikujuline alus, millesse on puuritud augud, et paigaldada kaks õhuvoolikut ja muda kõrvaldamise voolik, ning ülemine silinder, mis kruvitakse põhja külge ja millele on paigaldatud väljund, et tagada poorse poti teadaolev maht (3 liitrit). Üks õhuvoolikutest on varustatud õhuvoolu hajutava otsikuga (difuusorkiviga); teine on avatud otsaga ja asetatud potis kivi suhtes täisnurga all. Kõnealune süsteem tekitab keerise, mis on vajalik selleks, et poti sisu oleks täielikult segatud, ning tagab samuti lahustunud hapniku kontsentratsiooni üle 2 mg/l.

12. Vajalik arv seadmeid hoitakse reguleeritud temperatuuril vahemikus 5–20 °C (±1 °C) kas veevannis või püsiva temperatuuriga ruumis. Pumbad on vajalikud, et doseerida aeratsiooninõudesse uuritava kemikaali lahust ja settinud reovett nõutava kiirusega (vastavalt 0–1,0 ml/min ja 0–25 ml/min) ning kolmas pump on vajalik selleks, et kõrvaldada reomuda aeratsiooninõudest. Vajalik väga väike reomuda voolukiirus saavutatakse pumbaga, mis on seatud suuremale kiirusele ja mis lülitatakse aeg-ajalt sisse taimeriga lüliti abil, näiteks lülitatakse sisse 10 sekundiks minutis, pumpamiskiirus on 3 ml/min, mis annab kõrvaldamise kiiruse 0,5 ml/min.

Filtrimisseade või tsentrifuug

13. Kohaldatakse peatüki C10-A punkti 23.

Analüüsiseadmed

14. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 24.

Vesi

▼**M4**

15. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 25 ja 26.

Orgaaniline kasvukeskkond

16. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 27.

Sünteetiline reovesi

17. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 28.

Olmereovesi

18. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 29.

Aktiivmuda

19. Kohaldatakse peatüki C10-A punkti 30.

Uuritava kemikaali põhilahus

20. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 31 ja 32.

KATSE KÄIK

Inokulumi valmistamine

21. Kohaldatakse ainult peatüki C.10-A punkti 34; kasutage aktiivmuda (ligikaudu 2,5 g/l).

Katseseadmete arv

22. Lihtsa katse jaoks, s.o kõrvaldamise protsendi mõõtmiseks, on vajalik ainult üks muda retentsiooniaeg, kuid ligikaudsete kineetiliste konstantide arvutamiseks vajalike andmete saamiseks on vaja 4 või 5 muda retentsiooniaja väärtust. Tavaliselt valitakse väärtused vahemikus 2–10 päeva. Praktilistel kaalutlustel on kasulik teha katse samal ajal 4 või 5 muda retentsiooniajaga ühel temperatuuril; pikendatud uuringute puhul kasutatakse muudel temperatuuridel vahemikus 5–20 °C samu muda retentsiooniaja väärtusi või erinevat väärtuste vahemikku. Esmase biolagunemise (peamine kasutus) korral on ühe tingimuste komplekti jaoks vaja tavaliselt ainult ühte seadet. Täieliku biolagunemise korral on siiski iga tingimuste komplekti jaoks vaja kontrollseadet, millesse lisatakse reovett, kuid mitte uuritavat kemikaali. Kui arvatakse, et uuritavat kemikaali esineb kasutatavas reovees, oleks vaja kasutada esmase biolagunemise hindamisel kontrollseadmeid ja teha arvutustes vajalikud parandused.

Orgaanilise kasvukeskkonna ja uuritava kemikaali doseerimine

23. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 36–39, kuid pange tähele, et uuritava kemikaali lahust doseeritakse eraldi ja kasutatakse erinevaid muda kõrvaldamise määrasid. Samuti tuleb sagedasti jälgida (näiteks kaks korda päevas) sissevoolu, väljavoolu ja muda kõrvaldamise voolukiiruseid ning vajaduse korral neid kohandada, et erinevus soovitust oleks ±10 % piires. Kui olmereovee kasutamisel tekivad analüüsimeetoditega seotud probleemid, siis tehke katse sünteetilise reoveega, aga tuleb tagada, et erinevad kasvukeskkonnad annavad võrreldavaid kineetilisi andmeid.

Aktiivmuda seadmete käsitsemine

24. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 40–43, kuid reguleerige muda retentsiooniaega ainult muda „pideva” kõrvaldamise abil.

Proovide võtmine ja analüüsimine

25. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 44–50, selle erinevusega, et tuleb määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon ja soovi korral lahustunud orgaaniline süsinik; keemilist hapnikutarvet ei tohiks kasutada.

▼M4

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

26. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 52–54.

Katsetulemuste esitamine

27. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 56–62.

Kineetiliste konstantide arvutamine

28. Esmase biolagundamise protsendi esitamise asemel on realistlikum esitada uuritava kemikaali keskmine statsionaarse oleku kontsentratsioon väljavoolus ja kirjeldada, kuidas see sõltub puhasti erinevatest käitamise tingimustest. Seda on võimalik teha liites 6.2 esitatud võrrandi 6 abil, millest võib leida K_S, μ_m ja θ_{SC} väärtused (muda kriitiline retentsiooniaeg).

(Selle asemel võib leida K_S ja μm ligikaudsed väärtused, kasutades lihtsat arvutiprogrammi, millega võrrandi 2 (liide 6.2) järgi arvutatud teoreetilist kõverat sobitatakse saadud eksperimentaalsete väärtustega. Kuigi ühtki lahendust ei saa pidada ainsaks õigeks lahenduseks, on võimalik saada K_S ja μ_m mõistlikud ligikaudsed väärtused.)

Tulemuste hajuvus

29. On teada, et iga üksiku kemikaali jaoks saadud kineetiliste parameetrite väärtused hajuvad. Arvatakse, et muda kasvatamise tingimused ning samuti katses valdavalt esinenud tingimused (nagu punktis 5 ja muudes katsetes) mõjutavad saadud väärtusi oluliselt. Ühte sellise muutlikkuse tahku on arutanud Grady *et al.* (4), kes on soovitanud kasutada kineetilise eksperimendi käigus kultuuri saavutatava võimaliku füsioloogilise oleku kahe äärmusliku seisundi jaoks mõisteid „tegelikult esinev” (*extant*) ja „olemuslik” (*intrinsic*). Kui oleku muutumist katse jooksul ei lubata, väljendavad kineetilise parameetri väärtused selle keskkonna tingimusi, kust mikroorganismid hangiti; neid väärtusi nimetatakse tegelikult või parajasti esinevaks. Teise äärmuse korral, kui katsetingimused võimaldavad valgusünteesisüsteemi täielikku väljaarenemist ja seega maksimaalset võimalikku kasvukiirust, nimetatakse saadud kineetilisi parameetreid olemuslikuks ning need olenevad ainult substraadi laadist ja kultuuris sisalduvate bakterite tüüpidest. Juhinduda võib sellest, et tegelikult esinevad väärtused saadakse siis, kui substraadi kontsentratsiooni ja kompetentsete mikroorganismide suhe (S_o / X_o) hoitakse madal, näiteks 0,025, ning olemuslikud näitajad esinevad siis, kui suhe on kõrge, näiteks vähemalt 20. Mõlemal juhul peaks S_o olema asjakohase poolküllastatuse konstandiga Ks võrdne või seda ületama.

30. Tulemuste hajuvust ja muid biolagundamise kineetika tahke arutati hiljutises keskkonnatoksikoloogia ja -keemia ühingu õpikojas (5). Neist avaldatud ja kavandatavatest uuringutest peaks saama selgema arusaama reoveepuhastites toimivast kineetikast, mis lubab olemasolevaid andmeid paremini tõlgendada ning tulevasi katsemeetodeid paremini kavandada.

KIRJANDUS

1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.

2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.

3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼**M4**

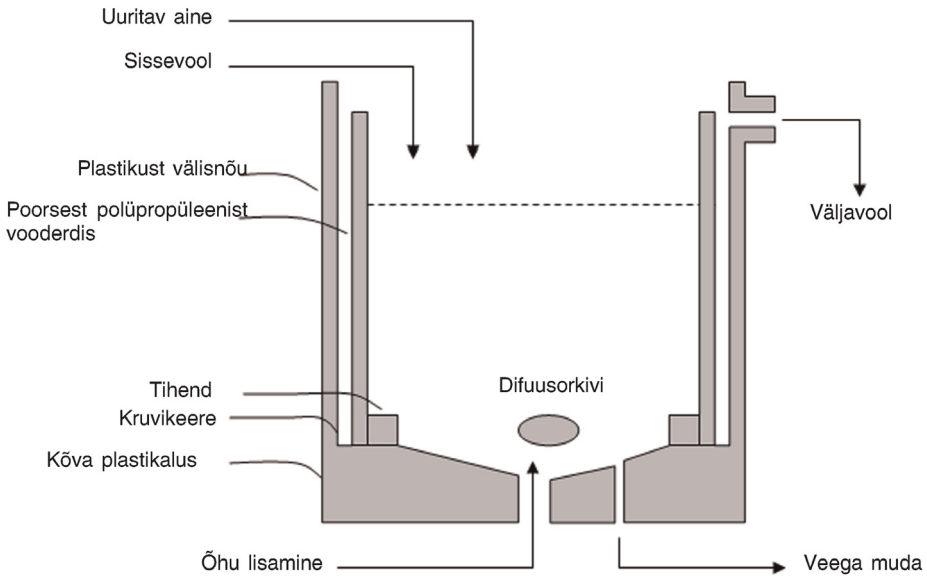
4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Liide 6.1

Muda retentsiooniaja reguleerimisega poorne pott



▼M4

Liide 6.2

Kineetiliste konstantide arvutamine

1. Kui eeldada Monod' kineetika kehtivust ning võtta arvesse aktiivsete tahkete osakeste ja substraadi massibilanssi aktiivmuda süsteemis (1), on võimalik leida järgmised statsionaarse oleku näitajad:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

või

$$S_l = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2],$$

kus

S_1 = substraadi kontsentratsioon väljavoolus (mg/l)

K_S = poolküllastatuse konstant, kontsentratsioon, mille juures $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = kasvu erikiirus (d^{-1})

μ_m = μ_m (d^{-1}) maksimumväärtus

K_d = aktiivsete tahkete osakeste kadumise erikiirus (d^{-1})

θ_S = muda keskmine retentsiooniaeg, SRT (d)

Selle võrrandi uurimisel võib teha järgmised järeldused:

i) väljavoolu kontsentratsioon ei sõltu sissevoolu kontsentratsioonist (S_0); seega muutub biolagundamise protsent sissevoolu kontsentratsiooni S_0 muutumisel;

ii) ainus juhitav puhasti parameeter, mis mõjutab S_1 väärtust, on muda retentsiooniaeg θ_S;

iii) sissevoolu kindla kontsentratsiooni S_0 puhul on olemas kriitiline muda retentsiooniaeg, mis vastab järgmistele tingimustele:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3],$$

kus

θ_{SC} = kriitiline muda retentsiooniaeg, millest väiksema väärtuse puhul uhutakse kompetentsed mikroorganismid puhastist välja;

iv) kuna võrrandi 2 muud parameetrid on seotud kasvu kineetikaga, mõjutab temperatuur tõenäoliselt substraadi sisaldust väljavoolus ja muda kriitilist vanust, s.o teatava töötlemismäära saavutamiseks vajalik muda retentsiooniaeg suureneb temperatuuri vähendamisega.

2. Poorse poti süsteemi tahkete ainete massibilansi alusel ja eeldades, et tahkete osakeste kontsentratsioon puhasti väljavoolus X_2 on väike aeratsiooninõu kontsentratsiooniga X_1 võrreldes, on muda retentsiooniaeg

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

ja,

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

kus

V = aeratsiooninõu maht (l)

X_1 = tahkete osakeste kontsentratsioon aeratsiooninõus (mg/l)

X_2 = tahkete osakeste kontsentratsioon väljavoolus (mg/l)

Q_0 = sissevoolu voolukiirus (l/d)

Q_1 = reomuda voolukiirus (l/d)

Seega on muda retentsiooniaega võimalik reguleerida mis tahes eelnevalt valitud väärtusele reomuda voolukiiruse Q_1 reguleerimisega.

Järeldused

3. Katse peamine eesmärk on seega võimaldada prognoosida kontsentratsiooni väljavoolus ja sellest tulenevalt uuritava kemikaali taset suublates.

4. Kui koostada väljavoolukontsentratsiooni S_1 retentsiooniajast θ_S sõltuvuse graafik, on mõnikord võimalik hinnata muda kriitilist retentsiooniaega θ_{SC}, vt kõver 3 joonisel 1. Kui see ei ole võimalik, võib arvutada θ_{SC} koos μ_m ja K_S ligikaudsete väärtustega, kui koostada S_1 sõltuvus $S_1 \bullet \theta_S$-st.

Võrrandi 1 teisendamisega saame:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Kui K_d on väike, siis $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ ja võrrandist 5 saame:

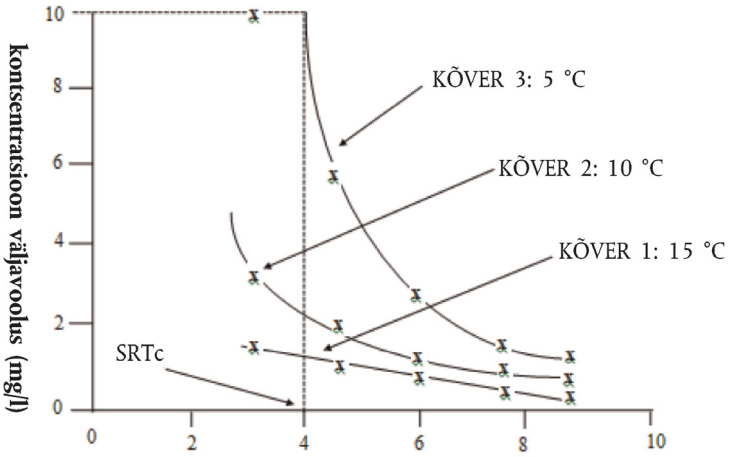
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Seega peaks graafik olema sirge joon (vt joonis 2) tõusuga $1/\mu_m$ ja alglõiguga K_S/μ_m; sellest tuleneb ka, et $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

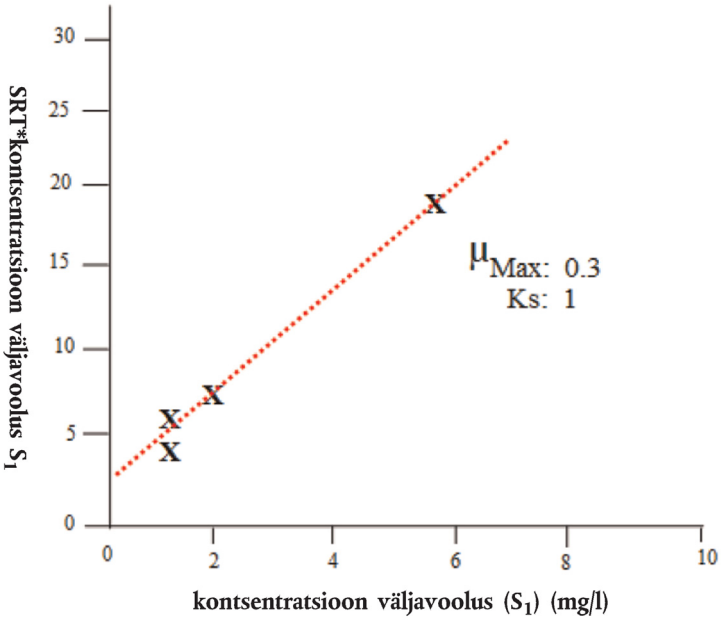
Joonis 1

Kolm temperatuuri; viis muda retentsiooniaega



Joonis 2

Muda retentsiooniaja regressioonijoon S_1 *vs.* S_1 T = 5 °C juures



Terminid:

kontsentratsioon väljavoolus

kõver

▼M4

7. liide

KATSE VÄIKESE KONTSENTRATSIOONI (µg/l) VAHEMIKUS

1. Paljud kemikaalid esinevad veekeskkonnas (isegi reovees) tavaliselt väga väheses kontsentratsioonis (µg/l). Sellises kontsentratsioonis ei ole need tõenäoliselt peamised kasvu põhjustavad substraadid; on tõenäoline, et neid lagundatakse kasvu mittepõhjustavate teiseste substraatidena koos mitmesuguste looduslike orgaaniliste ainetega. Seega ei vasta selliste kemikaalide lagunemine 6. liites esitatud mudelile. Võib kasutada mitmeid mudeleid ja reoveepuhastites peamiselt esinevates tingimustes võib samal ajal olla kasutatav rohkem kui üks mudel. Selle asjaolu täpsustamiseks tuleb teha palju rohkem uurimistööd.

2. Seni võib järgida põhitekstis (peatükk C.10-A) kirjeldatud meetodit, aga ainult esmase biolagundatavuse puhul, kasutades sobivalt väikseid kontsentratsioone (< 100 µg/l) ja valideeritud analüüsimeetodit. Kui võetakse arvesse ka abiootilisi protsesse (adsorptsioon, lendumine jne), võib arvutada biolagundatavuse protsendi (vt käesoleva katsemeetodi punkt 54). Näitena võib kasutada Nyholmi ja tema kolleegide uuringut (1, 2), milles uuritavat kemikaali lisati neljatunnise tsükliga täitmise ja tühjendamise süsteemi (*fill and draw system*). Nad teatasid pseudo-esimese järgu kineetilised konstandid viie kemikaali jaoks, mis lisati sünteetilisse reovette kontsentratsioonil 5–100 µg/l. (Täieliku biolagundatavuse jaoks võib kasutada ^{14}C märgistusega uuritavaid kemikaale.) Selle kirjeldamine jääb käesolevast katsemeetodist välja, kuna seni puuduvad kinnitatud meetodid, kuigi ISO 14592 (3) jaoks välja pakutud meetod sisaldab suuniseid ^{14}C märgistusega kemikaalide kasutamise kohta.

Poolpidev aktiivmudatest

3. Hiljem pakuti välja lihtsam kahest etapist koosnev katse (4, 5, 6); poolpideva aktiivmudatesti (SCAS testi) meetodile järgnevad lühiajalised kineetilised katsed poolpideva aktiivmudatesti seadmetest võetud proovidega. Poolpideva aktiivmudatesti süsteemi käitatakse muda kõrvaldamise teadaoleva määraga (erinevalt algsest katsemeetodist C.12) ja sinna lisatakse muudetud OECD sünteetilist reovett või olmereovett. Sünteetilist reovett muudeti (pH muutumise ja muda halva settivuse tõttu) ning lisati puhverdamiseks fosfaati, pärmiekstrakti, raud(III)kloriidi ja mikroelementide soolasid; selle keemiline hapnikutarve suurendati ligikaudu väärtuseni 750 mg/l peptooni ja lihaekstrakti kontsentratsiooni suurendamisega. Seadmeid käitati 24-tunnise tsükliga: aeratsioon 23 tunni vältel, muda kõrvaldamine, settimine, supernatandi (väljavoolu) kõrvaldamine, millele järgnes sünteetilise reovee lisamine ja uuritava kemikaali lisamine kuni kontsentratsioonini 100 µg/l (s.o ligikaudu samal kontsentratsioonil, mida kasutati kiirkatses). Kord nädalas vahetati 10 % mudakogusest värske muda vastu, et säilitada tasakaalustatud mikroobipopulatsiooni.

4. Uuritava kemikaali kontsentratsiooni mõõdetakse alguses ja aeratsiooni lõpus ning katset jätkatakse, kuni saavutatakse uuritava kemikaali konstantse kiirusega kõrvaldamine; selleks võib kuluda üks nädal kuni mitu kuud.

Kiirkatse

5. Uuritava kemikaali lagunemise pseudo-esimest järku kiiruskonstandi määramiseks teadaoleva, kuid erineva päritolu ja varasema kasutusega aktiivmudas kasutatakse kiirkatset (näiteks kaheksa tundi). Aklimatiseerumiskatse ajal (punktid 3 ja 4) võetakse poolpideva aktiivmudatesti reaktoritest muda proovid (aeratsiooni ajavahemiku lõpus, kui orgaanilise substraadi kontsentratsioon on väike). Võrdluseks võib võtta ka muda paralleelsest poolpideva aktiivmudatesti seadmest, mis ei ole uuritava kemikaaliga kokku puutunud.

▼M4

Muda segusid lisatud uuritava kemikaaliga (kaks või enam kontsentratsiooni vahemikus 1–50 μg/l) aereeritakse ilma sünteetilist reovett või muud orgaanilist substraati lisamata. Lahusesse alles jäänud uuritav kemikaal määratakse korrapäraste ajavahemike järel, näiteks iga tund, olenevalt kemikaali lagundatavusest, kuni 24 tunni jooksul. Enne sobiva analüüsimeetodi kasutamist proovid tsentrifuugitakse.

Arvutused

6. Poolpideva aktiivmudatesti seadmetega saadud andmeid kasutatakse uuritava kemikaali kõrvaldamise protsendi arvutamiseks (punkt 54). Samuti saab arvutada keskmise kiiruskonstandi K_1 (mis on hõljuvaine kontsentratsiooni järgi normaliseeritud) järgmisest võrrandist:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

kus

t = aeratsiooniaeg (23 h)

C_e = kontsentratsioon aeratsiooniaja lõpus (μg/l)

C_i = kontsentratsioon aeratsiooni alguses (μg/l)

SS = aktiivmuda tahkete osakeste kontsentratsioon (g/l)

7. Kiirkatses koostatakse uuritava kemikaali allesoleva kontsentratsiooni log% ajast sõltuvuse graafik ning graafiku alguse (10–50 % lagunemist) tõus on võrdväärne pseudo-esimest järku kiiruskonstandiga K_1. Konstant normeeritakse muda tahkete osakeste kontsentratsiooniga: tõus jagatakse läbi muda tahkete osakeste kontsentratsiooniga. Teatatud tulemus peab samuti sisaldama andmeid uuritava kemikaali ja hõljuvaine lähtekontsentratsioonide, muda retentsiooniaja, muda koguse ja päritolu kohta ning uuritava kemikaaliga eelneva kokkupuute kohta (kui see on toimunud).

Tulemuste hajuvus

8. Tulemuste hajuvust ja muid biolagundamise kineetika tahke arutati hiljutises keskkonnatoksikoloogia ja -keemia ühingu õpikojas (7). Neist avaldatud ja kavandatavatest uuringutest peaks saama selgema arusaama reoveepuhastites toimivast kineetikast, mis lubab olemasolevaid andmeid paremini tõlgendada ning tulevasi katsemeetodeid paremini kavandada.

KIRJANDUS

1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.

2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.

3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851–864.

5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711–735.

6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: biokiled

SISSEJUHATUS

1. Simulatsioonikatseid kasutatakse enamasti selliste kemikaalide puhul, mis kiire biolagundatavuse sõelumiskatse (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-A kuni C.4-F (9)) kohaselt ei ole kiiresti biolagundatavad, kuid mis on siiski iseeneslikult biolagunevad. Erandkorras kasutatakse simulatsioonikatset ka iga kemikaali puhul, mille kohta on vaja rohkem teavet, eelkõige masstootmises olevate kemikaalide puhul, ja tavaliselt kasutatakse aktiivmuda katset (C.10-A). Mõnel juhul vajatakse siiski konkreetset teavet kemikaali käitumise kohta biokiledega seotud reovee puhastamise meetodite puhul, eelkõige nõrgfiltrite, pöörlevate bioloogiliste kontaktseadmete ja keevkihttehnoloogiate puhul. Selle vajaduse täitmiseks on välja töötatud mitmesugused vahendid.

2. Gerike *et al.* (1) kasutasid suuri pooltööstuslikke nõrgfiltreid ühendatud režiimis. Need filtrid võtsid palju ruumi ja vajasid suhteliselt palju reovett või sünteetilist reovett. Truesdale *et al.* (2) kirjeldasid väiksemaid filtreid (läbimõõduga 6 jalga × 6 tolli), millesse lisati pindaktiivseid aineid mitte sisaldavat naturaalset reovett, kuid nende jaoks oli siiski vaja suhteliselt suuri reoveekoguseid. Valmis (küpse) biokile loomiseks kulus 14 nädalat ning pärast pindaktiivse uuritava aine esmakordset lisamist kulus veel 4–8 nädalat, enne kui biokile oli aklimatiseerunud.

3. Baumann *et al.* (3) töötasid välja palju väiksema filtri, milles biokilet toetava inertse kasvukeskkonnana kasutati eelnevalt aktiivmudas immutatud nn polüesterfliisi. Uuritavat kemikaali kasutati ainsa süsinikuallikana ja biolagundatavust hinnati sissevoolus ja väljavoolus lahustunud orgaanilise süsiniku mõõtmise teel ning väljunud gaasis CO_2 koguse hindamise alusel.

4. Hoopis erinevat lähenemisviisi kasutasid Gloyna *et al*. (4), kes leiutasid pöörleva torureaktori. Pöörleva toru sisepinnal kasvatati teadaoleval pindalal biokile, lastes läbi horisontaalsuuna suhtes väikese nurga all oleva toru ülemise osa kaudu lisatavat sissevoolu. Reaktorit on kasutatud pindaktiivsete ainete biolagundatavuse uurimiseks (5) ning samuti biokile optimaalse paksuse ja läbi kile difusiooni uurimiseks (6). Viimati nimetatud autorid arendasid reaktorit edasi, muu hulgas täiustades seda väljuvas gaasis CO_2 määramise võimaldamiseks.

5. Pöörleva torureaktori kinnitas analüütikute alaline komitee (Ühendkuningriik) kui standardmeetodi, millega hinnatakse kemikaalide biolagundatavust (7) ning reovete puhastatavust ja mürgisust (8). Siin kirjeldatud meetodi eelised on lihtsus, kompaktsus, korratavus ja orgaanilise kasvukeskkonna suhteliselt väikse koguse kasutamine.

KATSE PÕHIMÕTE

6. Kaldu oleva aeglaselt pöörleva toru sisepinnale lisatakse sünteetilist või olmereovett ja uuritavat kemikaali kas seguna või eraldi. Sisepinnale tekib mikroorganismide kiht, mis on samalaadne biofiltrites esinevaga. Reaktori kasutamise tingimused valitakse sellised, et tagada orgaanilise aine piisav kõrvaldamine ja vajaduse korral ammooniumi oksüdeerumine.

▼M4

7. Väljavool torust kogutakse ja kas setitatakse ja/või filtritakse enne lahustunud orgaanilise süsiniku ja/või uuritava kemikaali analüüsimist spetsiifilise meetodi abil. Samal ajal ja samadel tingimustel käitatakse võrdluseks kontrollkatse seadmeid, kuhu uuritavat kemikaali ei lisata. Katse- ja kontrollseadmete väljavoolus ilmnev lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni erinevus on eeldatavasti põhjustatud uuritavast kemikaalist ja selle orgaanilistest metaboliitidest. Seda erinevust võrreldakse lisatud uuritava kemikaali kontsentratsiooniga (väljendatud lahustunud orgaanilise süsinikuna), et arvutada uuritava kemikaali kõrvaldamine.

8. Biolagunemist on bioadsorptsioonist üldiselt võimalik eristada nii, et uuritakse hoolikalt kõrvaldamismäära ajast sõltuvuse graafikut. Tavaliselt saab seda kinnitada kiire biolagundatavuse katsega (hapniku sidumine või süsinikdioksiidi tekkimine), kasutades aklimatiseeritud inokulumi, mis on võetud katse lõpus nendest reaktoritest, kuhu on lisatud uuritavat kemikaali.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

9. Tulemuste õigeks tõlgendamiseks peaksid olema teada uuritava kemikaali puhtus, vees lahustuvus ning lenduvuse ja adsorptsiooniga seotud omadused.

10. Lenduvaid ja halvasti lahustuvaid kemikaale ei ole tavaliselt võimalik katsetada ilma erimeetmeid võtmata (vt peatüki C.10-A 5. liide). Samuti peaks olema teada keemiline struktuur või vähemalt empiiriline valem, et arvutada teoreetilised väärtused ja/või kontrollida parameetrite mõõdetud väärtusi, nagu teoreetiline hapnikutarve, lahustunud orgaaniline süsinik.

11. Sobiva katsekontsentratsiooni valimisel võivad abiks olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta mikroorganismidele (vt peatüki C.10-A 4. liide); väikeste biolagundamise väärtuste õigeks tõlgendamiseks on need hädavajalikud.

KÜNNISVÄÄRTUSED

12. Algul nõuti pindaktiivse kemikaali turule lubamiseks vähemalt 80 % esmast biolagundatavust. Kui 80 % künniseni ei jõuta, võib kohaldada kõnealust simulatsiooni (kinnitavat) katset ja pindaktiivset ainet võib turustada ainult juhul, kui rohkem kui 90 % konkreetsest kemikaalist kõrvaldatakse. Kemikaalide puhul üldiselt ei teki vastuvõetavuse/vastuvõetamatuse taseme küsimust ja saavutatud kõrvaldamise protsentväärtust võib kasutada tõenäolise keskkonnakontsentratsiooni ligikaudsetes arvutustes, mida kasutatakse kemikaalist põhjustatud ohu hindamiseks. Puhaste kemikaalide mitmes uuringus leiti, et olulises ulatuses biolagunevatest kemikaalidest rohkem kui kolme neljandiku puhul on lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr > 90 % ning sellistest kemikaalidest rohkem kui 90 % puhul on see > 80 %.

VÕRDLUSKEMIKAALID

13. Katse nõuetekohaseks tegemiseks on kasulik teha aeg-ajalt katseid võrdluskemikaalidega, mille käitumine on teada. Kõnealused kemikaalid on näiteks adipiinhape, 2-fenüülfenool, 1-naftool, difeenhape ja 1-naftoehape.

KATSETULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS

14. Ühendkuningriigi labor leidis, et katsete suhteline standardhälve ühes laboris oli 3,5 % ja katsete vahel 5 % (7).

▼M4

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

Pöörlevad torureaktorid

15. Seade (vt 8. liite joonised 1 ja 2) koosneb akrüültorude komplektist, milles iga toru pikkus on 30,5 cm ja siseläbimõõt 5 cm; torud asuvad kummiümbrisega ratastel, mis paiknevad metallist tugiraamis. Igal torul on ligikaudu 0,5 cm võrra välja ulatuv äärik, et toru püsiks ratastel. Sisepind on muudetud jämeda traatvillaga karedamaks ning ülemises (sissevoolu) otsas 0,5 cm võrra välja ulatuv sisemine äärik, mis hoiab vedelikku torus. Torud on rõhtasendi suhtes ligikaudu ühekraadise nurga all, et saavutada uuritava keskkonna läbi puhta toru suunamisel vajalik kokkupuuteaeg. Kummiümbrisega rattaid pööratakse aeglase reguleeritava kiirusega mootori abil. Torude temperatuuri reguleeritakse sellega, et seade asub püsiva temperatuuriga ruumis.

16. Kui iga torureaktor pannakse mõnevõrra suuremasse korgiga torusse ja tagatakse ühenduste õhutihedus, on võimalik koguda väljuv gaasiline CO_2 hilisemaks määramiseks leeliselahusesse (6).

17. Iga toru jaoks hoitakse 20 l nõus (A) (vt joonis 2) 24-tunnist orgaanilise kasvukeskkonna varu, vajaduse korral koos lisatud uuritava kemikaaliga. Vajaduse korral võib eraldi doseerida uuritava kemikaali lahust. Iga sellise nõu põhja lähedal on väljalase, mis on sobiva (näiteks silikoonkummist) toru ja peristaltilise pumba (B) kaudu ühendatud klaasist või akrüülist pealevoolutoruga, mis ulatub 2–4 cm võrra kalduoleva toru ülemise (pealevoolu-)otsa (C) sisse. Väljavoolul lastakse kallutatud toru alumisest otsast tilkuda, et koguda see teise nõusse (D). Väljavool setitatakse või filtritakse enne analüüsi tegemist.

Filtrimisseade-tsentrifuug

18. Proovide filtrimiseks mõeldud seade, milles on sobiva poorisuurusega (ava nominaalläbimõõt 0,45 μm) membraanfiltrid, mis adsorbeerivad orgaanilised kemikaalid ja millest vabaneb võimalikult vähe orgaanilist süsinikku. Kui kasutatakse filtreid, millest vabaneb orgaanilist süsinikku, tuleb filtreid hoolikalt pesta kuuma veega, et eemaldada väljauhutav orgaaniline süsinik. Selle asemel võib kasutada tsentrifuugi, mis tagab 40 000 m/s^2.

19. Seadmed, mis on vajalikud järgmise kindlaksmääramiseks:

— lahustunud orgaaniline süsinik, orgaanilise süsiniku kogusisaldus või keemiline hapnikutarve;

— konkreetne kemikaal, kui nõutakse selle määramist (kõrgefektiivne vedelikkromatograafia, gaaskromatograafia jne);

— pH, temperatuur, happelisus ja leeliselisus;

— ammoonium, nitrit ja nitraat, kui katse tehakse nitrifikatsiooni tingimustes.

Vesi

20. Kraanivesi, mis sisaldab vähem kui 3 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku.

21. Destilleeritud või deioniseeritud vesi, mis sisaldab vähem kui 2 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku.

▼M4

Orgaaniline kasvukeskkond

22. Orgaanilise kasvukeskkonnana võib kasutada sünteetilist reovett, olmereovett või nende segu. On tõendatud, et ainult olmereovee kasutamisel saadakse sageli suurem lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsent (aktiivmuda seadmetes) ning sellest saab biolagundada isegi mõnd sellist kemikaali, mis ei ole OECD sünteetilise reovee kasutamisel biolagundatav. Seega on soovitatav kasutada olmereovett. Lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni (või keemilist hapnikutarvet) tuleb mõõta igas uues orgaanilise kasvukeskkonna partiis. On vaja teada orgaanilise kasvukeskkonna happelisust või leeliselisust. Kui kasvukeskkonna happelisus või leeliselisus on väike, võib see vajada sobiva puhvri lisamist (naatriumvesinikkarbonaat või kaaliumvesinikfosfaat), et hoida katse ajal reaktoris pH väärtus ligikaudu 7,5 ± 0,5. Lisatava puhvri kogus ja lisamise aeg tuleb otsustada igal juhul eraldi.

Sünteetiline reovesi

23. Ühes liitris kraanivees lahustatakse 160 mg peptooni, 110 mg lihaekstrakti; 30 mg karbamiidi, 28 mg veevaba dikaaliumvesinikfosfaati (K_2HPO_4), 7 mg naatriumkloriidi (NaCl), 4 mg kaltsiumkloriiddihüdraati ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 2 mg magneesiumsulfaatheptahüdraati ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$). See OECD sünteetiline reovesi on näidis ja selle keskmine lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon sissevoolus on ligikaudu 100 mg/l. Alternatiivselt võib kasutada muid koostisi, millel on ligikaudu sama lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon ja mis on pärisreoveega sarnasemad. Kõnealuse sünteetilise reovee kontsentraadi võib valmistada destilleeritud veega ja hoida kuni ühe nädala temperatuuril 1 °C. Vajaduse korral lahjendatakse seda kraaniveega. (See kasvukeskkond ei ole rahuldav, näiteks lämmastiku kontsentratsioon on väga suur ja süsinikusisaldus on suhteliselt väike, kuid midagi paremat pole soovitatud, kuid kasvukeskkonna parandamiseks on soovitatud üksnes lisada puhvrina suuremas koguses fosfaati ja rohkem peptooni).

Olmereovesi

24. Kasutage värskelt settinud reovett, mida kogutakse iga päev peamiselt olmereovett töötlevast veepuhastuskäitisest. Seda tuleks koguda esmase settimise paagi ülevoolu kanalist või aktiivmudapuhasti sissevoolust ja see peaks üldiselt olema ilma suurte osakesteta. Seda reovett saab enne kasutamist hoida mitu päeva temperatuuril ligikaudu 4 °C, kui tõendatakse, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus (või keemiline hapnikutarve) ei ole hoidmise ajal olulisel vähenenud (s.o vähem kui 20 %). Süsteemi häirimise vähendamiseks tuleks igas uues partiis viia lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) enne kasutamist sobivale konstantsele väärtusele näiteks kraaniveega lahjendamise teel.

Määrdeaine

25. Peristaltilise pumba rullikute määrimiseks võib kasutada glütserooli või oliiviõli: mõlemad on sobivad silikoonkummist torudega kasutamiseks.

Uuritava kemikaali põhilahused

26. Kui kemikaal on piisavalt lahustuv, valmistage sobiva kontsentratsiooniga põhilahus (näiteks 1–5 g/l) deioniseeritud vees või sünteetilise reovee mineraalses osas. Lahustumatu kemikaali kohta vt peatüki C.10-A 5. liide. Seda meetodit ei saa torureaktoreid muutmata (punkt 16) kasutada lenduva kemikaali puhul. Määrake põhilahuses lahustunud orgaaniline süsinik ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus ning korrake mõõtmisi iga uue partii korral. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku ja orgaanilise süsiniku kogusisalduse erinevus on suurem kui 20 %, siis kontrollige uuritava kemikaali lahustuvust vees.

▼M4

Võrrelge lahustunud orgaanilist süsinikku või uuritava kemikaali kontsentratsiooni, mis on mõõdetud põhilahuses spetsiifilise analüüsimeetodi abil, nimiväärtusega, et näha, kas määramise saagis on piisavalt hea (tavaliselt võib eeldada > 90 %). Veenduge (eelkõige dispersiooni korral), kas lahustunud orgaanilist süsinikku saab kasutada analüüsiparameetrina või tuleb kasutada ainult spetsiifilist analüüsimeetodit, millega saab määrata uuritavat kemikaali. Dispersiooni puhul tuleb proovid tsentrifuugida. Iga uue partii puhul määrake lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve või uuritav kemikaal spetsiifilise analüüsimeetodi abil.

27. Määrake põhilahuse pH. Äärmuslikud väärtused osutavad, et kemikaali lisamine võib mõjutada aktiivmuda pH-d katsesüsteemis. Sel juhul neutraliseerige põhilahust väikse koguse anorgaanilise happe või alusega, et pH oleks 7 ± 0,5, kuid vältige uuritava kemikaali sadestamist.

KATSE KÄIK

Orgaanilise kasvukeskkonna doseerimine

28. Hoolitsege, et kõik sissevoolu- ja väljavoolunõud ning sissevoolunõust väljuv ja väljavoolunõusse sisenev toru on korralikult puhastatud, et seal katse alguses ja kogu katse vältel ei kasvaks mikroobe.

29. Valmistage värske sünteetiline reovesi (punkt 23) iga päev kas tahketest lähteainetest või kontsentreeritud põhilahusest, lahjendades seda vajaliku koguse kraaniveega. Mõõtke nõutav kogus silindriga välja ja viige see puhtasse sissevoolunõusse. Vajaduse korral lisage sünteetilisse reovette enne lahjendamist ka vajalik kogus uuritava kemikaali või võrdluskemikaali põhilahust. Kui nii on mugavam või saab sellega vältida uuritava kemikaali kadusid, siis valmistage eraldi mahutis uuritava kemikaali lahjendatud lahus ja sisestage see eraldi teise doseerimispumba abil kaldega torusse.

30. Teise võimalusena (ja eelistatavalt) kasutage settinud olmereovett (punkt 24), mis kogutakse võimaluse korral iga päev uuesti.

Pöörlevate torureaktorite käitamine

31. Ühe uuritava kemikaali hindamiseks vajatakse kahte identset torureaktorit ja need seatakse üles püsiva temperatuuriga ruumis, tavaliselt 22 ± 2 °C.

32. Reguleerige peristaltilisi pumpasid, et need pumpaksid orgaanilist kasvukeskkonda (ilma uuritava kemikaalita; 250 ± 25 ml/h) kaldega torudesse, mida pööratakse kiirusel 18 ± 2 pööret minutis. Lisage pumba torudele katse alguses ja katse vältel regulaarselt määrdeainet (punkt 25), et tagada korralik toimimine ja pikendada torude kasutusiga.

33. Reguleerige torude kalle rõhtasendi suhtes nii, et sissevoolulahus viibiks puhtas torus 125 ± 12,5 s. Hinnake viibimisaeg sissevoolu mittebioloogilise markeri (näiteks NaCl, inertse värvaine) lisamise teel: keskmiseks viibimisajaks arvestatakse väljavoolus tippkontsentratsioonini jõudmiseks vajalikku aega (kui on tekkinud maksimaalne kile, võib viibeaeg suureneda kuni ligikaudu 30 minutini).

34. Selliste määrade, kiiruste ja aegade juures on täheldatud piisavat lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamist (> 80 %) ning nitrifitseeritud väljavoolu tekkimist. Kui kõrvaldamine ei ole piisav või kui tuleb simuleerida konkreetse puhasti tulemusi, tuleks voolukiirust muuta. Viimati nimetatud juhul reguleerige orgaanilise kasvukeskkonna doseerimise kiirust, kuni reaktori töö tulemuslikkus vastab puhasti töö tulemuslikkusele.

▼M4

Inokulatsioon

35. Kui kasutatakse sünteetilist reovett, võib mikroorganismide kasvu algatamiseks piisata õhukaudsest inokulatsioonist, vastasel juhul aga lisage sisestusse kolme päeva jooksul 1 ml/l settinud reovett.

Mõõtmised

36. Kontrollige korrapäraste ajavahemike järel, et doosimäärad ja pöörlemiskiirused oleksid vajalikes piirides. Samuti mõõtke väljavoolu pH-d, eelkõige siis, kui eeldatakse nitrifitseerimist.

Proovide võtmine ja analüüsimine

37. Proovide võtmise meetod, skeem ja sagedus valitakse katse eesmärgi järgi. Näiteks võib sissevoolust ja väljavoolust võtta hetkeproove (*snap/grab*) või koguda proov pikema aja, näiteks kolme kuni kuue tunni vältel. Esimesel ajavahemikul, mil uuritavat kemikaali veel sees ei ole, võtke proove kaks korda nädalas. Filtrige proovid läbi membraanide või tsentrifuugige neid kiirusel ligikaudu 40 000 m/s^2 umbes 15 minutit (punkt 18). Enne läbi membraanide filtrimist võib olla vajalik lasta proovidel settida ja/või neid jämefiltriga filtrida. Määrake lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) vähemalt kaks korda ning vajaduse korral ka biokeemiline hapnikutarve, ammoonium ja nitrit/nitraat.

38. Kõik analüüsid tuleks teha pärast proovide kogumist ja ettevalmistamist võimalikult kiiresti. Kui analüüsid tuleb edasi lükata, säilitage proove tihedalt suletud pudelis pimedas ja temperatuuril ligikaudu 4 °C. Kui proove tuleb säilitada kauem kui 48 tundi, kasutage säilitamiseks sügavkülmutamist, hapestamist või sobiva mürgise kemikaali lisamist (näiteks 1 liitri kohta 20 ml elavhõbe(II)kloriidi lahuse (10 g/l) lisamisega). Kontrollige, et säilitamismeetod ei mõjutaks analüüsi tulemusi.

Sissetöötamisperiood

39. Sellel ajavahemikul kasvab pinna biokile optimaalse paksuseni, milleks kulub tavaliselt ligikaudu kaks nädalat ja milleks ei tohiks kuluda üle kuue nädala. Lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine (punkt 44) (või keemiline hapnikutarve) suureneb ja jõuab tasakaaluoleku väärtuseni. Kui torudes on jõutud sarnaste platooväärtusteni, valitakse üks toru ülejäänud katse vältel kontrollseadmena kasutamiseks ning sel ajal peaks torude tõhusus püsivaks jääma.

Uuritava kemikaali lisamine

40. Sellel etapil lisage vajaliku kontsentratsiooniga (tavaliselt 10–20 mg C/l) uuritavat kemikaali teise reaktorisse. Kontrollseadmesse lisatakse jätkuvalt ainult orgaanilist kasvukeskkonda.

Aklimatiseerumise ajavahemik

41. Jätkake lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) analüüside tegemist kaks korda nädalas ja esmase biolagundatavuse hindamiseks mõõtke ka uuritava kemikaali kontsentratsiooni spetsiifilise analüüsimeetodi abil. Laske süsteemil pärast uuritava kemikaali esmakordset lisamist üks kuni kuus nädalat (või eritingimustes pikemalt) aklimatiseeruda. Kui kõrvaldamise protsent (punktid 43–45) jõuab maksimumväärtuseni, mõõtke keskmise kõrvaldamisprotsendi hindamiseks platoofaasist ligikaudu kolme nädala vältel 12–15 kehtivat väärtust. Katse loetakse lõpetatuks, kui jõutakse piisavalt suure kõrvaldamise määrani. Pärast uuritava kemikaali esmakordset lisamist ei peaks katse kestus tavaliselt ületama 12 nädalat.

▼M4

Kile irdumine

42. Torust liigse kile suures koguses äkiline irdumine (*sloughing*) toimub suhteliselt korrapärase ajavahemiku järel. Selleks et kile irdumine ei mõjutaks tulemuste võrreldavust, peaks katse kestma vähemalt kaks täielikku kasvamise ja irdumise tsüklit.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

43. Arvutage uuritava kemikaali lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise protsent igal etteantud ajal järgmise võrrandi abil:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\%$$

kus

D_t = lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise protsent ajal t;

Cs = uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kontsentratsioon sissevoolus, mida hinnatakse eelistatavalt põhilahuse kontsentratsiooni ja selle lisatud koguse alusel (mg/l);

E = katse väljavoolus ajal t mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) väärtus (mg/l);

Eo = kontrollseadme väljavoolus ajal t mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) väärtus (mg/l).

Kui katsetatakse ka võrdluskemikaali, tehakse sama arvutus ka võrdluskemikaaliga.

Kontrollreaktori tõhusus

44. Kontrollreaktori poolt orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise määr (D_B) on kasulik teave, mis aitab hinnata katse ajal biokile biolagundamise aktiivsust. Arvutage kõrvaldamise protsent järgmise võrrandi alusel:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\%$$

kus

C_m = lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) kontrollseadme sissevoolu orgaanilises kasvukeskkonnas (mg/l).

45. Arvutage spetsiifilise analüüsimeetodiga uuritava kemikaali kõrvaldamine (D_{ST}) (kui seda mõõdetakse) igal hindamisajal järgmise võrrandi abil:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\%$$

kus

S_i = uuritava kemikaali mõõdetud või, eelistatavalt, hinnatud kontsentratsioon katse sissevoolus (mg/l);

S_e = uuritava kemikaali mõõdetud kontsentratsioon katse väljavoolus ajal t (mg/l).

▼M4

Kui analüüsimeetod annab muutmata reovees positiivse näitaja (S_c, mg/l), siis arvutage kõrvaldamise protsent (D_{SC}) järgmise võrrandi alusel:

$$D_{SC} = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\%$$

Katsetulemuste esitamine

46. Koostage kõrvaldamise protsendi D_t ja D_{ST} (või D_{SC}) (kui see on leitud) graafiline sõltuvus ajast (vt peatüki C.10-A 2. liide). Võtke platoofaasis määratud 12–15 D_T (ja D_{ST}, kui see on määratud) väärtustest uuritava kemikaali kõrvaldamise protsendi keskmine (väljendatud lähima täisarvuna) ja leidke standardhälve. Kõrvaldamise kõvera kujust saab teha järeldusi kõrvaldamises osalevate protsesside kohta.

Adsorptsioon

47. Kui uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr on suur kohe katse alguses, kõrvaldatakse uuritavat kemikaali tõenäoliselt biokilele adsorbeerimise teel. Seda võib olla võimalik tõendada irdunud kilest tahketele osakestele adsorbeerunud uuritava kemikaali määramisega. Tavaliselt ei jää adsorbeeritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine suuremahuliseks kogu katse vältel; üldiselt toimub alguses suur kõrvaldamine, mis langeb järk-järgult tasakaaluväärtusele. Kui adsorbeeritud uuritav kemikaal suudab aga põhjustada mikroobide populatsiooni aklimatiseerumise, siis suureneb seejärel uuritava kemikaali lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine ja jõuab kõrge platooväärtuseni.

Ootefaas

48. Nagu ka staatiliste sõelumiskatsete korral, nii vajavad mitmed uuritavad kemikaalid enne täieliku biolagunemise toimumist ootefaasi. Ootefaasis toimub kompetentsete bakterite aklimatiseerumine (või kohanemine) ja uuritavat kemikaali peaaegu ei kõrvaldata; seejärel toimub kõnealuste bakterite esialgne kasv. See faas lõpeb ja lagundamisfaasi alguseks loetakse hetke, kui ligikaudu 10 % uuritava kemikaali esialgsest kogusest on kõrvaldatud (võttes arvesse adsorptsiooni, kui see toimub). Ootefaasi pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

Platoofaas

49. Pidevas katses kõrvaldamist näitava kõvera platoofaas on määratletud kui faas, milles lagundamine on maksimaalne. See faas peaks kestma vähemalt kolm nädalat ja selle käigus tuleks mõõta ligikaudu 12–15 kehtivat näitajat.

Uuritava kemikaali keskmine kõrvaldamise määr

50. Arvutage uuritava kemikaali kõrvaldamise näitaja D_t (ja D_{st}, kui see on leitud) väärtuste alusel keskväärtus platoofaasis. See on uuritava kemikaali kõrvaldamise määr ümardatuna lähima täisarvuni (1 %). Samuti soovitatakse arvutada keskväärtuse 95 % usaldusvahemik. Arvutage samal viisil orgaanilise kasvukeskkonna keskmine kõrvaldamise määr (D_B) kontrollnõus.

▼M4

Biolagundamise tunnused

51. Kui uuritav kemikaal biokile külge märkimisväärselt ei adsorbeeru ja kõrvaldamise kõveral on ootefaasi, lagundamis- ja platoofaasiga biolagundamise kõvera tavapärane kuju (punktid 48, 49), võib olla kindel, et mõõdetud kõrvaldamine on põhjustatud biolagundamisest. Kui on toimunud suuremahuline esialgne kõrvaldamine, siis ei suuda simulatsioonikatse eristada bioloogilise ja abiootilise kõrvaldamise protsesse. Sellistel juhtudel ja muudel juhtudel, kui biolagundamise suhtes tekivad kahtlused (näiteks kui toimub väljapuhumine (*stripping*)), tuleb analüüsida adsorbeerunud uuritavat kemikaali kile proovidel või teha täiendavad biolagundamise staatilised (sõelumis)katsed selgelt bioloogilisi protsesse näitavate parameetrite alusel. Kõnealused katsed on hapniku sidumise meetodid (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-D, C.4-E ja C.4-F) (9) või katse, millega mõõdetakse CO_2 tekkimist (käesoleva lisa peatüki C.4 meetod C.4-C või *Headspace*-meetod) (10), kasutades inokulumina asjaomase reaktori eelnevalt kokkupuutunud biokilet.

52. Kui mõõdetud on nii lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist kui ka konkreetse kemikaali kõrvaldamist, siis näitab kõrvaldamisprotsentide oluline erinevus (kui esimene nimetatutest on viimati nimetatust väiksem) orgaaniliste vahesaaduste olemasolu väljavoolus; selliseid vahesaadusi võib olla keerulisem lagundada ja neid tuleks uurida.

Katsetulemuste kehtivus

53. Katset võib pidada kehtivaks, kui lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise määr (D_B) kontrollseadmetes on kahe nädala möödumisel > 80 % ja ei ole täheldatud ebatavalisi asjaolusid.

54. Kui on katsetatud kiirelt biolagundatavat (võrdlus)kemikaali, peaks biolagunemise määr olema > 90 % ja paralleelide erinevus ei tohiks olla suurem kui 5 %. Kui need kaks kriteeriumi ei ole täidetud, tuleb katse käik läbi vaadata ja/või hankida olmereovesi muust allikast.

55. Samuti ei tohiks uuritavat kemikaali töötlevate paralleelseadmete (kui neid kasutatakse) biolagundamise näitajate erinevus olla suurem kui 5 %. Kui see kriteerium ei ole täidetud, aga kõrvaldamise määr on suur, siis jätkake analüüsi veel kolme nädala vältel. Kui kõrvaldamise määr on väike, kontrollige uuritava kemikaali inhibeerivat mõju, kui see ei ole teada, ja korrake katset uuritava kemikaali väiksemal kontsentratsioonil, kui see on teostatav.

Katseprotokoll

56. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav kemikaal:

— tunnusandmed;

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused.

Katsetingimused:

— katsesüsteemi mis tahes muudatused, eelkõige lahustumatute või lenduvate ainetega katsete tegemisel;

— orgaanilise kasvukeskkonna tüüp;

— tööstuslike jäätmete osakaal reovees ja nende laad, kui neid kasutatakse ja need on teada;

— inokulatsioonimeetod;

▼M4

— uuritava kemikaali põhilahus – lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus; suspensiooni korral selle valmistamisviis; kasutatav(ad) katsekontsentratsioon(id), kui lahustunud orgaaniline süsinik jääb vahemikust 10–20 mg/l väljapoole, siis selle põhjendus; lisamise meetod; esmakordse lisamise kuupäev; mis tahes muutused kontsentratsioonis;

— keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg (ilma kasvuta); toru pöörlemiskiirus; ligikaudne kaldenurk, kui võimalik;

— andmed kile irdumise kohta; aeg ja intensiivsus;

— katsetemperatuur ja -vahemik;

— kasutatud analüüsimeetodid.

Katsetulemused:

— kõik mõõdetud andmed (lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve, uuritava kemikaali määramine spetsiifilise analüüsimeetodiga, pH, temperatuur, N-kemikaalid (kui see on asjakohane);

— kõik arvutatud D_t (või D_{tc}), D_B, D_s näitajad tabelite kujul ja kõrvaldamise kõverad;

— teave ootefaasi ja platoofaasi, katse kestuse, uuritava kemikaali, võrdluskemikaali (kui seda katses kasutati) ja orgaanilise kasvukeskkonna (kontrollseadmes) kõrvaldamise kohta koos statistilise teabe ja kinnitustega biolagundatavuse ja katse kehtivuse kohta;

— tulemuste arutelu.

KIRJANDUS

1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753–758.

2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441–444.

3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92–94.

6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865–881.

7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

9) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine", meetodid C.4-A kuni C.4-F.

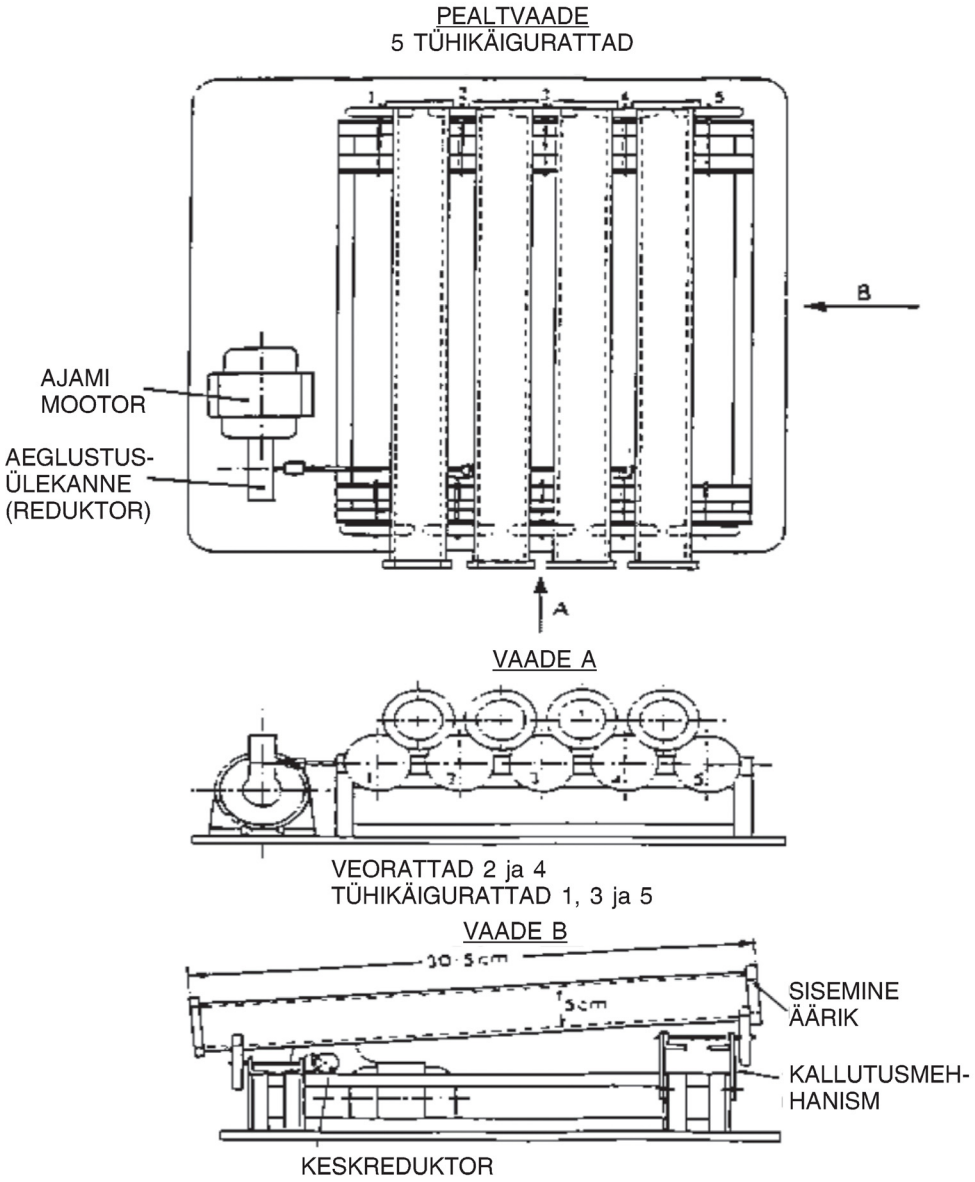
10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

8. liide

Joonis 1

Pöörlevad torud



Sõnastik

Pealtvaade

Vaade A/B

Veorattad

Tühikäigurattad

Ajami mootor

Aeglustusülekanne (reduktor)

Sisemine äärik

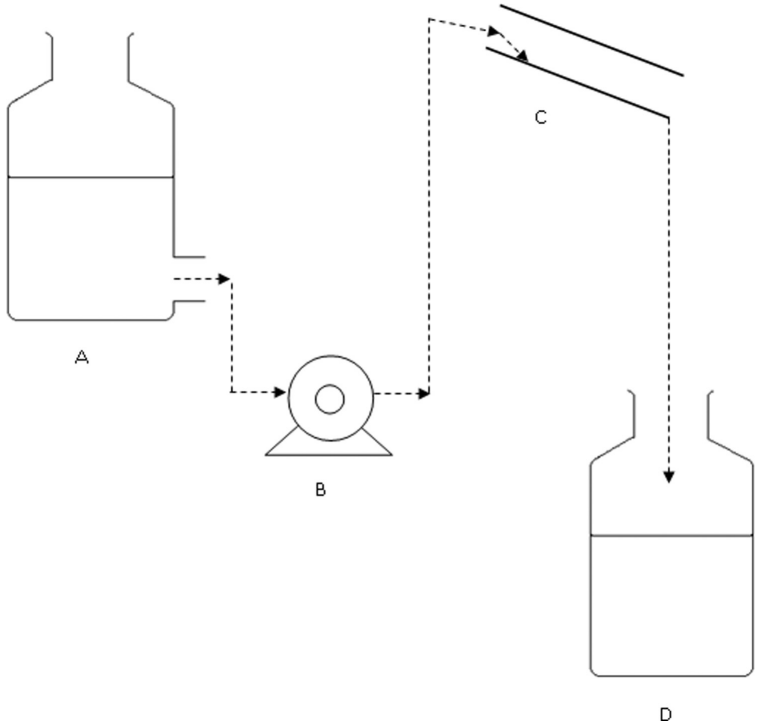
Kallutusmehhanism

Keskreduktor

▼**M4**

Joonis 2

Vooskeem



A. Söötenõu

B. Peristaltiline pump

C. Pöörlev toru

D. Väljavoolu kogumise nõu

MÕISTED

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Kemikaalid: „tuleb silmas pidada, et mõistet „kemikaal” kasutatakse ÜRO keskkonna- ja arengukonverentsi lepingutes ja edasistes dokumentides laia mõistena, mis hõlmab aineid, tooteid, segusid, valmistisi või mis tahes muid mõisteid, mida võib olemasolevates süsteemides hõlmatuse märkimiseks kasutada”.

▼M6

C.11. AKTIIVMUDA MIKROORGANISMIDE HINGAMISE (SÜSINIKU JA AMMOONIUMI OKSÜDEERIMISE) PÄRSSIMISE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 209 (2010). Selle meetodiga tehakse kindlaks kemikaali mõju aktiivmuda organismidele (eelkõige bakterid), mõõtes nende hingamise (süsiniku ja/või ammooniumi oksüdeerimise) kiirust kindlaksmääratud tingimustes uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel. Katsemeetod põhineb Värvainetootjate Ökoloogia- ja Toksikoloogiaühingu (ETAD) metoodikal (1, 2), varasemal OECD katsejuhendil nr 209 (3) ja muudetud standardil ISO 8192 (4). Katse eesmärk on hinnata kiirsõelumismeetodi abil kemikaali mõju reoveepuhastites bioloogilises (aeroobses) etapis kasutatava aktiivmuda organismidele. Katse tulemusi võib kasutada ka uuritava kemikaali selliste kontsentratsioonide kindlakstegemiseks, mille puhul hingamine ei pärssu ja mis sobivad kasutamiseks biolagunduvuse katsetes (nt käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-A kuni C.4-F, peatükid C.9, C.10, C.12 ja C.29 ning OECD katsejuhend nr 302C). Sel juhul võib katse läbi viia sõelkatsena, mis sarnaneb kontsentratsioonivahemiku leidmise katse või piirsisalduskatsega (vt punkt 39) ja milles vaadeldakse üksnes üldist hingamist. Kõnealusesse teabesse tuleks siiski suhtuda ettevaatlikult kohese biolagunduvuse katsete puhul (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-A kuni C.4-F ja peatükk C.29), kus inokulumi sisaldus on oluliselt väiksem kui käesoleva katsemeetodi puhul. Seega ei tähenda pärssiva mõju puudumine käesoleva meetodi kohases hingamiskatses automaatselt seda, et pärssiv mõju puudub ka käesoleva lisa peatüki C.4 meetodite C.4-A kuni C.4-F ja peatüki C.29 kohaselt tehtava kohese biolagunduvuse katse tingimustes.

2. Näib, et hingamise pärssumise katset on pärast käesoleva meetodi avaldamist üldjuhul kasutatud edukalt, kuid mõnel juhul on teatatud kahtlastest tulemustest (2, 4, 5). Kontsentratsiooni ja hingamise vahelise sõltuvuse kõverad on mõnikord kahefaasilised, asjaomased graafikud on moonutatud ja EC_{50} väärtused on eeldatust väiksemad (5). Uuringutest on selgunud, et sellised tulemused saadakse juhul, kui katses kasutatud aktiivmuda olulisel määral nitrifitseerib ja uuritava kemikaali mõju ammooniumi oksüdeerimisele on suurem kui üldisele heterotroofsele oksüdeerimisele. Seepärast võib selliste kahtlaste tulemuste tõlgendamiseks teha lisakatseid, kus kasutatakse spetsiifilist nitrifitseerimise inhibiitorit. Kui mõõta hapniku sidumise kiirust sellise inhibiitori, nt *N*-allüültiokarbamiidi juuresolekul ja selle puudumisel, on võimalik arvutada hapniku sidumise kiirus eraldi üldise hingamise, heterotroofse oksüdeerimise ja nitrifitseerimise puhul (4, 7, 8). Seega saab kindlaks teha uuritava kemikaali pärssiva mõju kahes kõnealuses protsessis ja arvutada tavapärasel viisil EC_{50} väärtused nii orgaanilise süsiniku oksüdeerimise (heterotroofne oksüdeerimine) kui ka ammooniumi oksüdeerimise (nitrifitseerimine) puhul. Tuleks silmas pidada, et mõnel üksikul juhul võib *N*-allüültiokarbamiidi inhibeeriv toime osaliselt või täielikult kaduda uuritava kemikaaliga või söötmelisandite, nt Cu^{++}-ioonidega kompleksi moodustamise tõttu (6). Cu^{++}-ioonid on *Nitrosomonas*'e puhul vajalikud, kuid on suuremas kontsentratsioonis mürgised.

3. On tekkinud tungiv vajadus kasutada reovee aeroobsel töötlemisel nitrifitseerimist, mis on vajalik etapp reoveest lämmastikuühendite kõrvaldamisel denitrifitseerimise teel gaasiliste lõppsaadustena; see vajadus ilmneb eelkõige Euroopa riikides, kuna EL on praeguseks kehtestanud veekogudesse juhitava puhastatud heitvee lämmastikusisalduse väiksemad piirmäärad ([1]).

([1]) Nõukogu direktiiv 91/271/EMÜ, 21. mai 1991, asulareovee puhastamise kohta (ELT L 135, 30.5.1991, lk 40).

▼**M6**

4. Enamikul juhtudel piisab meetodist, millega saab hinnata kemikaali mõju üksnes orgaanilise süsiniku oksüdeerimise protsessidele. Mõnel juhul on tulemuste tõlgendamiseks ja toime mõistmiseks siiski vaja uurida kemikaali mõju üksnes nitrifitseerimisele või eraldi nii nitrifitseerimisele kui ka orgaanilise süsiniku oksüdeerimisele.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

5. Hingamise kiirust kunstliku reoveega kokku puutuvates aktiivmuda proovides mõõdetakse hapnikuelektroodi sisaldavas suletud kambris kolme tunni pikkuse kokkupuuteaja järel. Tegelikus olukorras esinevaid kokkupuutetingimusi arvesse võttes võib olla asjakohane kokkupuuteaega pikendada. Kui uuritav kemikaal laguneb kiiresti, näiteks abiootilise hüdrolüüsi teel, või kui selle kontsentratsiooni nõuetekohane hoidmine ei ole kemikaali lenduvuse tõttu võimalik, võib lisaks kasutada lühemat kokkupuuteaega – nt 30 minutit. Aktiivmuda iga partii tundlikkust tuleks kokkupuute päeval kontrollida sobiva võrdluskemikaaliga. Meetodit kasutatakse tavaliselt uuritava kemikaali EC_x (nt EC_{50}) ja/või täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) määramiseks.

6. Orgaanilist süsinikku oksüdeerivate mikroorganismide ja ammooniumi oksüdeerivate mikroorganismide hapnikusidumise pärssimist võib väljendada eraldi, kui mõõta hapniku sidumise kiirust spetsiifilise inhibiitori *N*-allüültiokarbamiidi juuresolekul ja selle puudumisel; nimetatud inhibiitor pärsib ammooniumi oksüdeerimist nitritiks esimese etapi nitrifitseerivate bakterite toimel. Sellisel juhul arvutatakse hapniku sidumise kiiruse vähenemise määr protsentides, võrreldes hapniku sidumise kiirust uuritava kemikaali juuresolekul sama näitaja keskväärtusega vastavates uuritava kemikaalita kontrollproovides nii spetsiifilise inhibiitori *N*-allüültiokarbamiidi juuresolekul kui ka selle puudumisel.

7. Abiootilistest protsessidest tuleneva hapniku sidumise määramiseks võib teha kindlaks kõnealuse näitaja väärtuse uuritava kemikaali, kunstliku reovee ja vee segudes, mis ei sisalda aktiivmuda.

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

8. Tulemuste õigeks tõlgendamiseks on vaja teada uuritava kemikaali identifitseerimisandmeid (soovitatavalt CASi number), nimetust (IUPAC), puhtust, vees lahustuvust, aururõhku, lenduvust ja adsorbeerumisega seotud omadusi. Tavaliselt ei ole lenduvaid kemikaale võimalik nõuetekohaselt katsetada ilma erimeetmeid võtmata (vt punkt 21).

KATSEMEETODI KASUTATAVUS

9. Katsemeetodit võib kasutada vees lahustuvate, raskesti lahustuvate ja lenduvate kemikaalide puhul. Alati ei pruugi siiski olla võimalik määrata piiratud lahustuvusega kemikaalide EC_{50} väärtusi ning lenduvate kemikaalide puhul saadakse nõuetekohased tulemused üksnes juhul, kui suurem osa uuritavast kemikaalist (hinnanguliselt > 80 %) jääb kokkupuuteperioodi(de) lõpuks reaktsioonisegusse. Kui uuritava kemikaali püsivuse või lenduvuse suhtes on kahtlusi, tuleks EC_x väärtuse täpsustamise võimaldamiseks esitada täiendavad toetavad analüüsiandmed.

▼M6

VÕRDLUSKEMIKAALID

10. Võrdluskemikaalidega kontrollimist tuleks teha korrapäraselt, et tagada katsemeetodi ja katsetingimuste usaldusväärsus ning kontrollida aktiivmuda iga partiid, mida kasutatakse kokkupuute päeval mikroobide inokulumina. Pärssiva võrdluskemikaalina soovitatakse kasutada 3,5-diklorofenooli, mis on tuntud hingamise pärssija ja mida kasutatakse paljudes pärssiva mõju või mürgisuse tuvastamise katsetes (4). Samuti võib üldist hingamist pärssiva võrdluskemikaalina kasutada vask(II)sulfaatpentahüdraati (9). Nitrifitseerimist pärssiva võrdluskemikaalina võib kasutada *N*-metüülaniliini.

NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID JA REPRODUTSEERITAVUS

11. Hapniku sidumise kiirus kontrollproovides (ilma uuritava kemikaali või võrdluskemikaalita) ei tohiks olla väiksem kui 20 mg hapnikku aktiivmuda (hõljuvaine kuivmassi) grammi kohta tunnis. Väiksema kiiruse korral tuleks katset korrata pestud aktiivmuda või muust allikast pärit mudaga. Paralleelsetes kontrollproovides mõõdetud hapniku sidumise kiiruse variatsioonikordaja ei tohiks lõpliku katse lõpus olla suurem kui 30 %.

12. Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni (ISO) korraldatud 2004. aasta rahvusvahelises võrdlusuuringus (4), kus kasutati olmereoveest pärit aktiivmuda, leiti 3,5-diklorofenooli EC_{50} jäävat üldise hingamise puhul vahemikku 2–25 mg/l, heterotroofse hingamise puhul vahemikku 5–40 mg/l ja nitrifitseerimist põhjustava hingamise puhul vahemikku 0,1–10 mg/l. Kui 3,5-diklorofenooli EC_{50} ei ole asjaomases eeldatavas vahemikus, tuleks katset korrata muust allikast pärit aktiivmudaga. Vask(II)sulfaatpentahüdraadi EC_{50} peaks üldise hingamise puhul jääma vahemikku 53–155 mg/l (9).

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Katsenõud ja seadmed

13. Lisaks tavapärastele laboriseadmetele tuleks kasutada järgmist:

a) katsenõud, näiteks keeduklaasid mahuga 1 000 ml, kuhu saab lisada 500 ml reaktsioonisegu (vt joonis 1, nr 5);

b) ühendustega kamber lahustunud hapniku sisalduse mõõtmiseks; sobiv hapnikuelektrood; suletud kamber proovi jaoks ilma vabaruumita ning salvestusseade (vt 2. liites joonis 1, nr 7, 8 ja 9); alternatiivina võib kasutada BHT pudelit, millel on hapnikuelektroodi kasutamist võimaldav sobiv kork pudelisuu õhukindlaks sulgemiseks (vt 3. liites joonis 2). Et hoida ära väljasurutava vedeliku kadu hapnikuelektroodi sisestamisel, on soovitatav sisestada läbi korgi esmalt lehter või klaastoru või kasutada väljakaarduva suuga nõusid. Mõlemal juhul tuleks kasutada magnetsegistit või mõnda muud segamismeetodit, nt segistiga andurit;

c) magnetsegistid ja inertse materjaliga kaetud segamispulgad mõõtekambris ja/või katsenõudes kasutamiseks;

d) aereerimisseade: vajaduse korral tuleks suruõhk juhtida tolmu ja õli kõrvaldamiseks läbi sobiva filtri ja õhu niisutamiseks läbi vett sisaldavate pesupudelite. Nõude sisu aereerimiseks tuleks kasutada Pasteuri pipette

▼M6

või muid aereerimisseadmeid, mis ei adsorbeeri kemikaale. Muda hapnikutarbe rahuldamiseks ja raskuste vältimiseks töötamisel selliste kemikaalidega, mis tekitavad palju vahtu, kaovad oma lenduvuse tõttu või on õhu barboteerimisel põhineva aereerimise puhul raskesti hajutatavad, võib kasutada orbitaalloksutit, mis töötab pöörlemiskiirusel 150–250 p/min ja võimaldab kasutada kolbe mahuga näiteks 2 000 ml. Katsesüsteem hõlmab tavaliselt mitut pidevalt aereeritavat keeduklaasi, millega alustatakse katset järgemööda (nt intervalliga umbes 10–15 minutit) ja mida seejärel järgemööda analüüsitakse. Võib kasutada ka valideeritud seadmeid, mis võimaldavad üheaegselt segusid aereerida ja neis hapnikutarbimise kiirust mõõta;

e) pH-meeter;

f) üldotstarbeline lauatsentrifuug muda jaoks, kiirendusega vähemalt 10 000 m/s^2.

Reaktiivid

14. Katses tuleks kõikjal kasutada analüütilise puhtusastmega reaktiive.

Vesi

15. Tuleks kasutada destilleeritud või deioniseeritud vett, mis sisaldab vähem kui 1mg/l lahustunud hapnikku, välja arvatud juhul, kui on ette nähtud kasutada kloorivaba kraanivett.

Kunstlik reovesi

16. Söötme valmistamiseks tuleks kasutada koostisainete järgmisi koguseid:

— peptoon	16 g;
— lihaekstrakt (või sellega võrreldav köögiviljaekstrakt)	11 g;
— karbamiid	3 g;
— naatriumkloriid (NaCl)	0,7 g;
— kaltsiumkloriiddihüdraat ($CaC1_2 \cdot 2H_2O$)	0,4 g;
— magneesiumsulfaatheptahüdraat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 g;
— veevaba dikaaliumvesinikfosfaat (K_2HPO_4)	2,8 g;
— lahuse ruumala viiakse destilleeritud või deioniseeritud veega 1 liitrini.	

17. Lahuse pH peaks olema 7,5 ± 0,5. Kui valmistatud lahust ei kasutata kohe, tuleks seda säilitada valguse eest kaitstult temperatuuril 0–4 °C mitte kauem kui üks nädal või tingimustes, mille juures lahuse koostis ei muutu. Tuleks silmas pidada, et kõnealune kunstlik reovesi on 100 korda kontsentreeritum kui reovesi, mida kirjeldatakse OECD 11. juuni 1976. aasta tehnilises aruandes „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents” („Kavandatav meetod sünteetilistes detergentides kasutatavate pindaktiivsete ainete biolagunduvuse määramiseks”), ning peale selle on sinna lisatud dikaaliumvesinikfosfaati.

▼M6

18. Söötme koostisained võib enne säilitamist ka eraldi steriliseerida, samuti võib peptooni ja lihaekstrakti lisada vahetult enne katse algust. Söödet tuleks enne kasutamist korralikult segada ja vajaduse korral tuleks pH reguleerida tasemele 7,5 ± 0,5.

Uuritav kemikaal

19. Vees hästi lahustuva uuritava aine sisaldus põhilahuses ei tohiks ületada aine vees lahustuvuse piirkontsentratsiooni (sademe esinemine ei ole vastuvõetav). Vees raskesti lahustuv aine, adsorbeeruv aine ja selline segu, mille koostisained on erineva vees lahustuvusega, tuleks vajalik kogus kaaluda otse katsenõusse. Sellises olukorras võib olla võimalik kasutada põhilahuseid, kui lahustunud uuritava kemikaali sisaldus katsenõus määratakse analüüsi teel enne aktiivmuda lisamist. Lahustunud uuritava kemikaali sisalduse analüütiline määramine katsenõus on vajalik ka juhul, kui valmistatakse vesiekstraktid. Tuleks hoiduda orgaaniliste lahustite ja dispergeerivate ainete või emulgaatorite kasutamisest lahustuvuse suurendamiseks. Põhilahuste töötlemine ultraheliga ja suspensioonide eelsegamine näiteks öö läbi on võimalik juhul, kui on olemas piisav teave uuritava kemikaali püsivuse kohta sellistes tingimustes.

20. Uuritav kemikaal võib mõjutada pH-d katsesüsteemis. pH tuleks enne katse alustamist määrata uuritavat kemikaali sisaldavas segus eelkatse abil, millega tehakse kindlaks, kas pH-d on vaja enne põhikatset reguleerida, ning põhikatse päeval tuleks pH-d uuesti kontrollida. Vajaduse korral tuleks uuritava kemikaali lahused/suspensioonid enne inokulumi lisamist neutraliseerida. Kuna neutraliseerimine võib aga muuta kemikaali keemilisi omadusi, võib olenevalt uuringu eesmärgist teha lisakatseid, et hinnata uuritava kemikaali mõju mudale olukorras, kus pH-d ei reguleerita.

21. Lenduva kemikaali mürgine mõju võib kemikaali kao tõttu kokkupuuteperioodi vältel muutuda, eriti katsetes, kus läbi süsteemi barboteeritakse õhku. Sellise aine puhul tuleks olla ettevaatlik ja analüüsida asjaomast ainet sisaldavaid kontrollsegusid aine sisalduse suhtes ning muuta aereerimistingimusi.

Võrdluskemikaal

22. Kui võrdluskemikaalina kasutatakse 3,5-diklorofenooli, tuleks valmistada 1 000 ml vesilahust, mis sisaldab 1,00 g 3,5-diklorofenooli (15). Lahustumise kiirendamiseks tuleks kasutada sooja vett ja/või ultraheliga töötlemist ning lasta lahusel enne selle ruumala vajalikule tasemele viimist toatemperatuurini jahtuda. Seejuures tuleks tagada, et võrdluskemikaali struktuur lahustamise käigus ei muutu. Lahuse pH-d tuleks kontrollida ja vajaduse korral reguleerida see NaOH või H_2SO_4 abil tasemele 7–8.

23. Kui võrdluskemikaalina kasutatakse vask(II)sulfaatpentahüdraati, kasutatakse kontsentratsioone 58 mg/l, 100 mg/l ja 180 mg/l (jada tegur 1,8). Aine kaalutud kogus (lõppruumala 500 ml puhul 29, 50 või 90 mg) lisatakse otse katsenõusse. Seejärel lahustatakse see 234 ml autoklaavitud kraanivees. Vask(II)sulfaatpentahüdaat on hästi lahustuv. Katse alustamisel lisatakse 16 ml kunstlikku reovett ja 250 ml aktiivmuda.

▼M6

Nitrifitseerimist spetsiifiliselt pärssiv aine

24. Tuleks valmistada *N*-allüültiokarbamiidi põhilahus kontsentratsiooniga 2,32 g/l. Selle põhilahuse lisamisel koguses 2,5 ml inkubeerimissegusse lõppruumalaga 500 ml saadakse *N*-allüültiokarbamiidi lõppsisalduseks 11,6 mg/l (10^{-4} mol/l); see on olemasolevate andmete kohaselt piisav (4), et täielikult pärssida nitrifitseerimine nitrifitseerivas aktiivmudas, mille hõljuvaine sisaldus on 1,5 g/l.

Abiootilised kontrollproovid

25. Teatud harvaesinevates tingimustes võib tugeva redutseerija omadustega uuritav kemikaal tekitada mõõdetava abiootilise hapnikutarbimise. Sellisel juhul on vaja kasutada abiootilisi kontrollproove, et eristada uuritava kemikaali abiootilist hapnikusidumist mikroobide hingamisest. Abiootilised kontrollproovid võib valmistada nii, et katsesegust jäetakse välja inokulum. Inokulumita abiootilisi kontrollproove võib kasutada ka toetavate analüütiliste mõõtmiste tegemisel, et määrata katse kokkupuuteetapis saavutatav kontsentratsioon, näiteks kui kasutatakse vees raskesti lahustuvate kemikaalide põhilahuseid ja asjaomaste koostisainete lahustuvus vees on erinev. Erijuhul võib olla vajalik kasutada abiootilise kontrollproovi valmistamisel inokulumi, mis on steriliseeritud näiteks autoklaavimise teel või steriliseerivate mürkainetega. Mõni kemikaal võib vabastada või siduda hapnikku ka üksnes piisavalt suure reaktsioonipinna korral, ehkki tavaliselt võib selleks olla vaja palju kõrgemat temperatuuri või rõhku. Seda silmas pidades tuleks pöörata erilist tähelepanu peroksüühenditele. Steriliseeritud inokulumi puhul on tegemist suure reaktsioonipinnaga.

Inokulum

26. Üldotstarbel kasutatavat aktiivmuda tuleks koguda tõhusalt käitatava, peamiselt olmereovett töötleva reoveepuhasti aereerimisbasseini väljalaskekohast või selle koha lähedalt. Olenevalt katse eesmärgist võib kasutada ka muud tüüpi või muust allikast pärit sobivat aktiivmuda, näiteks laboris kasvatatud muda, kui selle hõljuvaine sisaldus viiakse sobivasse kontsentratsioonivahemikku 2–4 g/l. Eri puhastitest pärit mudal on tõenäoliselt siiski erinevad omadused ja tundlikkus.

27. Muda võib kasutada sellisel kujul, nagu see on kogutud, kuid sellel tuleks suurte osakeste kõrvaldamiseks lasta lühikest aega, näiteks 5–15 minutit settida ja väiksemaid osakesi sisaldav ülemine kiht dekanteerida või kõrvaldada suured osakesed sõelumise teel (nt sõelaga, mille ava pindala on 1 mm^2). Teise võimalusena võib muda homogeniseerida segisti abil umbes 15 sekundi vältel või kauem, kuid tuleb hoolikalt jälgida, et ei esineks kauakestva homogeniseerimise puhul tekkida võivaid nihkejõude ega temperatuurimuutust.

28. Sageli on vaja muda pesta, näiteks kui endogeenne hingamiskiirus on väike. Esmalt tuleks muda niikaua tsentrifuugida, kuni supernatant selgineb ja reovee tahked osakesed sademesse kogunevad, näiteks 10 minutit kiirendusel umbes 10 000 m/s^2. Vedel supernatant tuleks eemaldada ja muda tuleks kloorivabas kraanivees uuesti suspendeerida loksutamise teel ning seejärel tuleks pesuvesi pärast uuesti tsentrifuugimist eemaldada. Vajaduse korral tuleks pesemist ja tsentrifuugimist korrata. Tuleks määrata taassuspendeeritud muda kuivmass teadaolevas ruumalas ning seejärel tuleks muda vedeliku eemaldamise teel kontsentreerida või kloorivaba kraaniveega veelgi lahjendada, et saavutada muda tahkete osakeste nõutav kontsentratsioon 3 g/l. Aktiivmuda tuleks katsetemperatuuril pidevalt aereerida (nt kiirusel 2

▼M6

l/min) ja võimaluse korral tuleks see kogumise päeval ära kasutada. Kui see ei ole võimalik, tuleks mudale kahe järgneva päeva jooksul lisada kummalgi päeval kunstlikku reovett (50 ml kunstlikku reovett aktiivmuda liitri kohta). Seejärel kasutatakse muda katses ja katsetulemused loetakse nõuetekohaseks, kui hindamistulemustest selgub, et endogeense heterotroofse ja nitrifitseerimist põhjustava hingamise kiirus mudas ei ole oluliselt muutunud.

29. Inkubeerimisel võib tekitada probleeme vahutamine, kui vahu pinnal olevad tahked mudaosakesed aereerimisnõust koos vahuga välja kantakse. Mõnikord võib vahutamist põhjustada ka lihtsalt kunstliku reovee juuresolek, kuid vahutamine on ootuspärane sellise kemikaali puhul, mis on pindaktiivne aine või sisaldab sellist ainet. Muda tahkete osakeste kadu katsesegust toob kaasa hingamiskiiruse kunstliku vähenemise, mida võidakse ekslikult tõlgendada hingamise pärssimise tulemusena. Peale selle kaasneb pindaktiivse aine lahuse aereerimisega aine kontsentreerumine vahukihti ning vahu kadu katsesüsteemist põhjustab kokkupuutekontsentratsiooni vähenemist. Vahutamist on võimalik vähendada lihtsate mehaaniliste võtetega (nt aeg-ajalt käsitsi klaaspulgaga segades) või sellise vahutamisvastase silikooniemulsiooni lisamisega, mis ei sisalda pindaktiivset ainet, ja/või loksutamisel põhineva aereerimismeetodi kasutamisega. Kui vahutamine on seotud kunstliku reovee juuresolekuga, tuleks reovee koostist muuta ja lisada sellesse vahutamisvastast ainet näiteks koguses 50 µl reovee liitri kohta. Kui vahutamist põhjustab uuritav kemikaal, tuleks määrata vahutamise vähendamiseks vajalik kogus kemikaali suurimal katses kasutataval kontsentratsioonil ning lisada sama kogus igasse aereerimisnõusse, sealhulgas nõudesse, kus vahutamist ei esine (nt uuritava kemikaalita kontrollnõud ja võrdluskemikaaliga nõud). Vahutamisvastase aine kasutamisel ei tohiks see aine reageerida inokulumi ega uuritava kemikaaliga.

KATSE KÄIK

30. Võib teha kindlaks kemikaali pärssiva mõju hapniku sidumisele kolmel eri viisil: üldisele, üksnes heterotroofsele ja nitrifitseerimisega seotud sidumisele. Tavaliselt piisab üldist hapnikusidumist pärssiva mõju kindlakstegemisest. Orgaanilise süsiniku oksüdeerimisega seotud heterotroofse hapnikusidumise ja ammooniumi oksüdeerimisega seotud hapnikusidumise mõju on vaja määrata juhul, kui asjaomase kemikaali puhul on nõutav kahe nimetatud näitaja eraldi kindlakstegemine või kui soovitakse selgitada, miks üldise hapnikusidumise pärssumise ja kemikaali kontsentratsiooni vahelise sõltuvuse kõver on ebatüüpilise kujuga.

Katsetingimused

31. Katse tuleks teha temperatuuril 20 ± 2 °C.

Katsesegud

32. Tuleks valmistada vett, kunstlikku reovett ja uuritavat kemikaali sisaldavad katsesegud (F_T), milles uuritava kemikaali nominaalne sisaldus on erinev (vt koostisainete koguste näited tabelis 1). pH tuleks vajaduse korral reguleerida tasemele 7,5 ± 0,5, segusid tuleks veega lahjendada ja lisada inokulum, et saada nõudes võrdse lõppruumalaga lahused, ning seejärel alustada aereerimist.

Võrdlussegud

33. Võrdlussegud (F_R) tuleks valmistada samal viisil kui katsesegud, lisades uuritava kemikaali asemel võrdluskemikaali, nt 3,5-diklorofenooli.

▼M6

Kemikaalita kontrollproovid

34. Katsetes, kus katsenõudega alustatakse katset järgemööda teatava intervalliga, tuleks kemikaalita kontrollproovid (F_B) valmistada kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus. Katsetes, kus kasutatakse hapnikutarbimise üheaegset mõõtmist võimaldavaid seadmeid, tuleks iga üheaegselt analüüsitava partii puhul kasutada vähemalt kahte kemikaalita kontrollproovi. Kemikaalita kontrollproovid sisaldavad muude segudega samas koguses aktiivmuda ja kunstlikku reovett, kuid ei sisalda uuritavat ega võrdluskemikaali. Proovid tuleks lahjendada veega sama ruumalani kui katse- ja võrdlussegud.

Abiootilised kontrollproovid

35. Vajaduse korral, näiteks kui on teada või kahtlustatakse, et uuritav kemikaal on tugeva redutseerija omadustega, tuleks abiootilise hapnikutarbimise mõõtmiseks valmistada segu F_A. See segu peaks sisaldama katseseguga samas koguses uuritavat kemikaali ja kunstlikku reovett ning olema sama ruumalaga, kuid mitte sisaldama aktiivmuda.

Katse üldine käik ja mõõtmised

36. Katse- ja võrdlussegusid ning kemikaalita ja abiootilisi kontrollproove inkubeeritakse katsetemperatuuril sundaereerimise tingimustes (0,5–1 l/min), et hoida lahustunud hapniku sisaldust tasemel, mis vastab vähemalt 60–70 protsendile küllastuskontsentratsioonist, ja tagada mudahelveste püsimine suspensioonis. Mudahelveste suspensioonis hoidmiseks on vaja kultuure ka segada. Inkubeerimise algushetkeks loetakse hetke, mil aktiivmuda inokulum puutub esmakordselt kokku lõppsegu muude koostisainetega. Inkubeerimise lõppedes – tavaliselt on ettenähtud kokkupuuteaeg kolm tundi – võetakse lahustest proovid, et mõõta lahustunud hapniku sisalduse vähenemist selleks otstarbeks ette nähtud kambris (3. liide, joonis 2) või täielikult täidetud BHT pudelis. Inkubeerimise alustamise viis sõltub ka hapnikutarbimise kiiruse mõõtmiseks kasutatava seadme läbilaskevõimest. Kui kasutatakse näiteks ühte hapnikuandurit, tehakse mõõtmised üksteise järel. Sellisel juhul tuleks valmistada erinevad katseks vajalikud kunstliku reoveega segud, kuid jätta välja inokulum; vajalik kogus muda tuleks lisada igasse katseseeria nõusse eraldi. Seejärel tuleks alustada ükshaaval inkubeerimist sobiva intervalliga, näiteks iga 10–15 minuti järel. Teisel juhul võib mõõtesüsteem koosneda mitmest andurist, mis võimaldavad teha üheaegselt mitu mõõtmist; sel juhul võib lisada inokulumi asjaomaste rühmade nõudesse üheaegselt.

37. Aktiivmuda hõljuvaine nominaalne sisaldus kõigis katse- ja võrdlussegudes ning kemikaalita segudes (kuid mitte abiootilistes kontrollsegudes) on 1,5 g/l. Hapnikutarbimist tuleks mõõta kolme tunni pikkuse kokkupuuteperioodi järel. Vajaduse korral tuleks mõõtmised teha lisaks ka 30 minuti pikkuse kokkupuuteperioodi järel, nagu on kirjeldatud eespool punktis 5.

Muda nitrifitseerimisvõime

38. Et kindlaks teha, kas ja millise kiirusega on muda võimeline nitrifitseerima, tuleks valmistada kemikaalita kontrollsegud (F_B) ja täiendavad kontrollsegud (F_N), mis sisaldavad lisaks *N*-allüültiokarbamiidi kontsentratsioonis 11,6 mg/l.

▼M6

Segusid tuleks aereerida ja inkubeerida temperatuuril 20 ± 2 °C kolm tundi. Seejärel tuleks mõõta hapniku sidumise kiirus ja arvutada nitrifitseerimisest tuleneva hapnikusidumise kiirus.

Katsete kavandamine

Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse

39. Vajaduse korral tehakse eelkatse, et leida uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemik, mida saaks kasutada lõplikus katses hapnikutarbimist pärssiva mõju kindlakstegemiseks. Kui uuritav kemikaal ei pärsi eelkatses hapnikutarbimist, võib see tähendada, et lõpliku katse tegemine ei ole vajalik, kuid sel juhul peaks eelkatse hõlmama suurima kasutatud kontsentratsiooni puhul (tavaliselt 1 000 mg/l, kuid see oleneb andmenõuetest) kolme paralleelproovi.

Tabel 1.

Eelkatses kasutatavate segude näited.

Reaktiiv	Algkontsentratsioon				
Uuritava kemikaali põhilahus	10 g/l				
Kunstliku söötme põhilahus	Vt punkt 16				
Aktiivmuda põhisuspensioon	Hõljuvaine sisaldus 3 g/l				
Segude koostisained	Katsenõudesse lisatavad kogused (a)				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Uuritava kemikaali põhilahus (ml) (punktid 19–21)	0,5	5	50	0	50
Kunstliku reovee põhilahus (ml) (punkt 16)	16	16	16	16	16
Aktiivmuda suspensioon (ml) (punktid 26–29)	250	250	250	250	0
Vesi (punkt 15)	233,5	229	184	234	434
Segude lõppruumala	500	500	500	500	500
Kontsentratsioonid segudes					
Uuritav suspensioon (mg/l)	10	100	1 000	0	1 000
Aktiivmuda (hõljuvaine) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

(a) Võrdluskemikaali puhul tuleks toimida samamoodi, et valmistada lahused nõudesse F_{R1-3}.

40. Katses kasutatakse uuritavat kemikaali vähemalt kolmes kontsentratsioonis, näiteks 10, 100 ja 1 000 mg/l, samuti kemikaalita kontrollproove ja vajaduse korral ka vähemalt kolme abiootilist kontrollproovi, mis sisaldavad uuritavat kemikaali suurimas kasutatavas kontsentratsioonis (vt näide tabelis 1). Eelistatavalt ei tohiks kemikaal avaldada väikseimal kontsentratsioonil mingit

▼M6

mõju hapnikutarbimisele. Tuleks arvutada hapniku sidumise ja vajaduse korral ka nitrifitseerimise kiirus ning seejärel pärssumise määr protsentides. Olenevalt katse eesmärgist on võimalik määrata ka üksnes mürgisus piirkontsentratsioonil (nt 1 000 mg/l). Kui sel kontsentratsioonil ei täheldata statistiliselt olulist mürgist mõju, ei ole edasine testimine suuremal ega väiksemal kontsentratsioonil vajalik. Tuleks silmas pidada, et vees raskesti lahustuva aine, adsorbeeruva aine ja sellise segu puhul, mille koostisained on erineva vees lahustuvusega, tuleks vajalik kogus kaaluda otse katsenõusse. Sellisel juhul tuleks lisada uuritava aine põhilahuse jaoks jäetud ruumala ulatuses lahjendusvett.

Lõplik katse

Üldise hapnikusidumise pärssumine

41. Katses tuleks kasutada eelkatse põhjal kindlaks määratud kontsentratsioonivahemikku. Et leida nii NOEC kui ka EC_x (nt EC_{50}), on enamikul juhtudel soovitatav kasutada kuut kontrollproovi ning viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas, sealjuures iga kontsentratsiooni puhul viit paralleelproovi. Kui eelkatses ei tuvastatud hapniku sidumist, ei ole abiootilist kontrollproovi vaja uuesti kasutada, kuid hapniku märkimisväärse sidumise korral tuleks kasutada abiootilisi kontrollproove uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil. Muda tundlikkuse kontrollimiseks tuleks kasutada võrdluskemikaali 3,5-diklorofenooli. Kuna on teada, et muda tundlikkus on muutuv, tuleks kontrollida tundlikkust iga katseseeria puhul. Kõikidel juhtudel võetakse katsenõudest 3 tunni pärast ja vajaduse korral ka 30 minuti pärast proovid, et mõõta hapniku sidumise kiirust hapnikuelektroodiga kambris. Kogutud andmete põhjal arvutatakse hingamise erikiirus kontroll- ja katsesegudes ning seejärel leitakse allpool esitatud võrrandi 7 abil pärssumise määr protsentides.

Heterotroofsele hingamisele ja nitrifitseerimisele avalduva pärssiva mõju eristamine

42. Spetsiifiliselt nitrifitseerimist pärssiva inhibiitori *N*-allüültiokarbamiidi kasutamine võimaldab vahetult hinnata uuritava kemikaali pärssivat mõju heterotroofsele oksüdeerimisele ning kui lahutada üldise hapnikusidumise kiirusest (*N*-allüültiokarbamiidi puudumisel) hapnikusidumise kiirus *N*-allüültiokarbamiidi juuresolekul, saab kindlaks teha ka mõju nitrifitseerimise kiirusele. Vastavalt katseplaanile tuleks valmistada kaks rühma reaktsioonisegusid, et määrata kooskõlas punktis 41 kirjeldatuga EC_x või NOEC, kuid lisaks tuleks ühe rühma igasse segusse lisada *N*-allüültiokarbamiidi, et saavutada inhibiitori lõppkontsentratsioon 11,6 mg/l, mille puhul on tõendatud nitrifitseerimise täielik pärssumine mudas, mille hõljuvaine sisaldus on kuni 3 000 mg/l (4). Hapniku sidumise kiirust tuleks mõõta kokkupuuteperioodi lõpus; see vahetult mõõdetav väärtus iseloomustab üksnes heterotroofset hingamist ning selle näitaja ja üldise hingamise kiiruse erinevus väljendab nitrifitseerimise kiirust. Seejärel arvutatakse pärssumise määrad.

Mõõtmised

43. Pärast kokkupuuteperioodi lõppu tuleks esimesest aereerimisnõust võetud proov viia hapnikuelektroodiga kambrisse (2. liide, joonis 1) ja viivitamata mõõta lahustunud hapniku sisaldus proovis. Kui mõõtesüsteem on mitme elektroodiga, võib mõõtmisi teha üheaegselt. On oluline segada proovi kaetud magneti abil samal kiirusel, mida kasutatakse elektroodi kaliibrimiseks, et tagada anduri reageerimine muutuvale hapnikusisaldusele minimaalse viivitusega ja võimaldada teha mõõtenõus korrapäraseid ja reprodutseeritavaid mõõtmisi. Mõnele hapnikuelektroodile lisatud segistisüsteem on

▼M6

tavaliselt selleks piisav. Kambrit tuleks mõõtmiste vahel veega loputada. Teise võimalusena võib võetud prooviga täita BHT pudeli (3. liide, joonis 2), mis on varustatud magnetsegistiga. Seejärel tuleks paigaldada pudelisuule koonusüleminek hapnikuanduriga ning panna magnetsegisti tööle. Mõlemal juhul tuleks pidevalt mõõta lahustunud hapniku sisaldust ja salvestada andmeid teatava perioodi vältel, tavaliselt 5–10 minuti jooksul või kuni hapnikusisaldus langeb alla 2 mg/l. Elektrood tuleks eemaldada, segu tuleks viia tagasi aereerimisnõusse ning aereerimist ja segamist tuleks jätkata, kui on vaja teha veel mõõtmisi pikema kokkupuuteperioodi järel.

Uuritava kemikaali sisalduse kontrollimine

44. Mõnel juhul võib olla vaja mõõta uuritava kemikaali kontsentratsiooni katsenõus. Tuleks silmas pidada, et kui kasutatakse:

— vees raskesti lahustuva aine põhilahust,

— sellise segu põhilahust, mille koostisained on erineva vees lahustuvusega, või

— vees hästi lahustuva aine põhilahust, milles aine sisaldus on lähedal vees lahustuvuse piirkontsentratsioonile,

ei ole lahustunud fraktsiooni osakaal teada ja seega ei ole teada ka katsenõusse viidava uuritava kemikaali tegelik kontsentratsioon. Kokkupuute iseloomustamiseks on vaja analüütiliselt hinnata uuritava kemikaali kontsentratsiooni katsenõus. Hindamise lihtsustamiseks tuleks analüüs teha enne inokulumi lisamist. Kuna katsenõusse viiakse üksnes lahustunud fraktsioon, võib mõõdetav kontsentratsioon olla väga väike.

45. Aeganõudva ja kuluka analüüsi asemel soovitatakse lihtsalt kaaluda uuritava kemikaali kogus otse katsenõusse ja lähtuda järgnevates arvutustes kaalutud kogusele vastavast nominaalsest algsisaldusest. Uuritava kemikaali lahustunud, lahustumata ja adsorbeerunud fraktsiooni eristamine ei ole vajalik, sest kõik need fraktsioonid esinevad ka reoveepuhastis valitsevates reaalsetes tingimustes ning nende osakaal võib sõltuvalt reovee koostisest varieeruda. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on hinnata realistlikult kontsentratsiooni, mille juures pärssiv mõju puudub, ning sellega ei saa üksikasjalikult uurida, millised fraktsioonid aktiivmuda organisme pärsivad. Adsorbeeruvad ained tuleks samuti kaaluda otse katsenõusse ja nõu peaks olema adsorbeerumisest tuleneva kao minimeerimiseks silaanitud.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Hapniku sidumise kiiruse arvutamine

46. Hapniku sidumise kiirus tuleks arvutada lähtuvalt mõõdetud väärtuste keskmisest, kasutades näiteks hapnikusisalduse ajas muutumise kõvera lineaarset osa ja piirdudes arvutustes hapnikusisalduse väärtuste vahemikuga 2,0–7,0 mg/l, kuna neist väärtustest suurem või väiksem sisaldus võib juba ise mõjutada hapnikutarbimise kiirust. Kummalegi poole nimetatud vahemikku jäävate kontsentratsioonivahemike kasutamine on mõnikord siiski vältimatu

▼**M6**

ja vajalik, näiteks juhul, kui hingamine on tugevalt pärsitud ja seega väga aeglane või kui mõne konkreetse aktiivmuda hingamine on väga kiire. See on vastuvõetav juhul, kui sidumiskõvera asjaomased pikendatud lõigud on sirged ja nende tõus ei muutu hapnikusisalduse vahemiku 2,0–7,0 mg/l piirest väljumisel. Mis tahes kõver lõik graafikul osutab mõõtesüsteemi stabiliseerumisele või hapniku sidumise kiiruse muutumisele ning sellist lõiku ei tohiks hingamiskiiruse arvutamisel kasutada. Hapniku sidumise kiirust tuleks väljendada milligrammides liitri kohta tunnis (mg/lh) või milligrammides kuiva muda grammi kohta tunnis (mg/gh). Hapnikutarbimise kiiruse R (mg/lh) võib arvutada või interpoleerida hapnikusisalduse vähenemise graafiku lineaarse osa põhjal vastavalt võrrandile 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1),$$

kus

Q_1 on hapnikusisaldus lineaarse faasi valitud lõigu alguspunktis (mg/l),

Q_2 on hapnikusisaldus lineaarse faasi valitud lõigu lõpp-punktis (mg/l) ja

Δ_t on kahe kõnealuse mõõtmise vaheline ajavahemik (min).

47. Hingamise erikiirust (R_s) väljendatakse tarbitud hapniku kogusena muda kuivmassi grammi kohta tunnis (mg/gh) vastavalt võrrandile 2:

$$R_s = R / SS \quad (2),$$

kus SS on hõljuvaine sisaldus katsesegus (g/l).

48. Hapnikutarbimise kiiruse R eri indeksid, mida võib kasutada koos, on järgmised:

S erikiirus,

T üldine hingamiskiirus,

N nitrifitseerimisega seotud hingamise kiirus,

H heterotroofse hingamise kiirus,

A abiootiliste protsessidega seotud hapnikutarbimise kiirus,

B hapnikutarbimise kiirus kemikaalita kontrollproovides (keskmine).

Nitrifitseerimisest tuleneva hapnikusidumise kiiruse arvutamine

49. Üldise hingamiskiiruse (R_T), nitrifitseerimisega seotud hingamise kiiruse (R_N) ja heterotroofse hingamise kiiruse (R_H) seost väljendab võrrand 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3),$$

kus

R_N on nitrifitseerimisest tuleneva hapnikusidumise kiirus (mg/lh),

R_T on mõõdetud hapnikusidumise kiirus kemikaalita kontrollproovis, kuhu ei ole lisatud *N*-allüültiokarbamiidi (F_B) (mg/lh) ja

R_H on mõõdetud hapnikusidumise kiirus kemikaalita kontrollproovis, kuhu on lisatud *N*-allüültiokarbamiidi (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. See seos kehtib kemikaalita kontrollproovide (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiootiliste kontrollproovide (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) ja uuritava kemikaaliga proovide (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh) puhul. Hingamise erikiirus arvutatakse järgmiselt:

$$R_{NS} = R_N / SS \quad (4);$$

$$R_{TS} = R_T / SS \quad (5);$$

$$R_{HS} = R_H / SS \quad (6).$$

51. Kui R_N osakaal on eelkatses piisavalt väike (nt < 5 % R_T väärtusest kemikaalita kontrollproovides), võib lähtuda eeldusest, et heterotroofne hapnikusidumine on võrdne üldise hapnikusidumisega ja nitrifitseerimist ei toimu. Kui katsetega soovitakse hinnata mõju heterotroofsetele ja nitrifitseerivatele mikroorganismidele, tuleks kasutada mõnest muust allikast pärit aktiivmuda. Lõplik katse tehakse juhul, kui uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel täheldatakse hapnikusidumise kiiruse vähenemist.

Hapnikutarbimise pärssumise protsendilise määra arvutamine

52. Üldise hapnikutarbimise pärssumise protsentuaalne määr I_T uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil leitakse vastavalt võrrandile 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA}) / R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7).$$

53. Heterotroofse hapnikusidumise pärssumise protsentuaalne määr I_H uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil leitakse samal viisil vastavalt võrrandile 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA}) / R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8).$$

54. Nitrifitseerimisest tuleneva hapnikusidumise pärssumise määr I_N igal kontsentratsioonil leitakse vastavalt võrrandile 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H) / (R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9).$$

55. Tuleks koostada graafik, mis väljendab hapnikusidumise pärssumise protsentuaalse määra sõltuvust uuritava kemikaali sisaldusest (pärssumiskõver; vt 4. liide, joonis 3). Pärssumiskõver koostatakse iga kolmetunnise ja vajaduse korral ka 30 minuti pikkuse aereerimisperioodi kohta. Tuleks arvutada või graafiku põhjal interpoleerida uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures hapnikusidumine väheneb 50 % võrra (EC_{50}). Sobivate andmete olemasolu korral võib arvutada või interpoleerida EC_{50} usalduspiirid usaldusnivool 95 %, kõvera tõusu ning pärssimisvahemiku algust (nt EC_{10} või EC_{20}) ja lõppu (nt EC_{80} või EC_{90}) tähistavad asjakohased väärtused.

56. Tuleks silmas pidada, et sageli täheldatavat tulemuste varieeruvust arvestades võib paljudel juhtudel piisata tulemuste täiendavast väljendamisest suurusjärgu põhiselt, näiteks järgmiselt:

EC_{50} < 1 mg/l;

EC_{50} 1–10 mg/l;

EC_{50} 10–100 mg/l;

EC_{50} > 100 mg/l.

Tulemuste tõlgendamine

EC_x

▼M6

57. EC_x väärtused ning nende alumised ja ülemised usalduspiirid usaldusnivool 95 % arvutatakse asjakohaste statistiliste meetoditega (nt probitanalüüs, logistiline või Weibulli funktsioon, kohandatud Spearmani-Kärberi meetod või lihtne interpoleerimine (11)). EC_x leidmiseks sisestatakse kasutatavasse võrrandisse kontrollproovide keskväärtusest x % moodustav väärtus. EC_{50} või mõne muu EC_x arvutamiseks tuleks kasutatud kontsentratsioonidele vastavate keskmiste väärtuste (x) suhtes kohaldada regressioonanalüüsi.

NOEC hindamine

58. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha kindlaks NOEC, on vaja statistilisi andmeid iga nõu kohta (eraldi nõusid käsitletakse paralleelproovidena). Tuleks kasutada asjakohaseid statistilisi meetodeid kooskõlas OECD dokumendiga „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" („Praegused meetodid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks: rakendamissuunised") (11). Uuritava kemikaali pärssiva mõju hindamiseks kontrollrühmaga võrreldes kasutatakse üldjuhul hüpoteesi ühepoolset (väiksemamahulist) kontrollimist p väärtusel $\leq 0{,}05$.

Katseprotokoll

59. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, puhtus;

— uuritava kemikaali füüsikalis-keemilised omadused (nt log K_{ow}, lahustuvus vees, aururõhk, Henry konstant (H) ja võimalik teave kemikaali käitumise, nt aktiivmudale adsorbeerumise kohta).

Katsesüsteem:

— päritolu, reoveepuhasti käitamistingimused, puhastisse sissevoolu allikas ning aktiivmuda kontsentratsioon, eeltöötlus ja säilitamine.

Katsetingimused:

— katsetemperatuur, pH katse ajal ja kokkupuuteperioodi(de) kestus.

Tulemused:

— hapnikutarbimise erikiirus kontrollproovides (milligrammi O_2 muda grammi kohta tunnis);

— kõik mõõteandmed, pärssumiskõver(ad) ja EC_{50} arvutamise meetod;

— EC_{50} ja võimaluse korral selle usalduspiirid usaldusnivool 95 %, samuti võimaluse korral EC_{20} ja EC_{80}; kui EC_{50} ei ole võimalik kindlaks teha, siis NOEC ja kasutatud statistilised meetodid;

— andmed hingamise üldise pärssumise ning vajaduse korral heterotroofse ja nitrifitseerimisega seotud hingamise pärssumise kohta;

— abiootiline hapnikusidumine füüsikalis-keemiliste omaduste hindamiseks ette nähtud kontrollproovides (kui neid kasutatakse);

— võrdluskemikaali nimetus ja selle kemikaaliga saadud tulemused;

— kõik tulemusi mõjutada võivate asjaoludega seotud tähelepanekud ja kõrvalekalded standardmeetodist.

KIRJANDUS

(1) Brown, D., Hitz, H. R., ja Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10: 245–261.

▼**M6**

(2) King, E. F., ja Painter, H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxic. Assess*. 1: 27–39.

(3) OECD (1984). Activated sludge, Respiration inhibition test. Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals. OECD, Pariis.

(4) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (2007). ISO 8192: Water Quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(5) Bealing, D. J. (2003). Dokument ISO/TC147/WGI/N.183, Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon.

(6) Painter, H. A., ja Jones, K. (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms. *J. Appl. Bacteriol*. 26: 471–483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxic. Assess*. 1: 515–524.

(8) Robra, B. (1976). *Wasser/Abwasser* 117: 80.

(9) Fiebig, S., ja Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresen. Environ. Bull*. 13: 1556–1557.

(10) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1995). ISO 10634: Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18. OECD, Pariis.

▼**M6**

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Kemikaal – aine või segu.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC_{50} on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

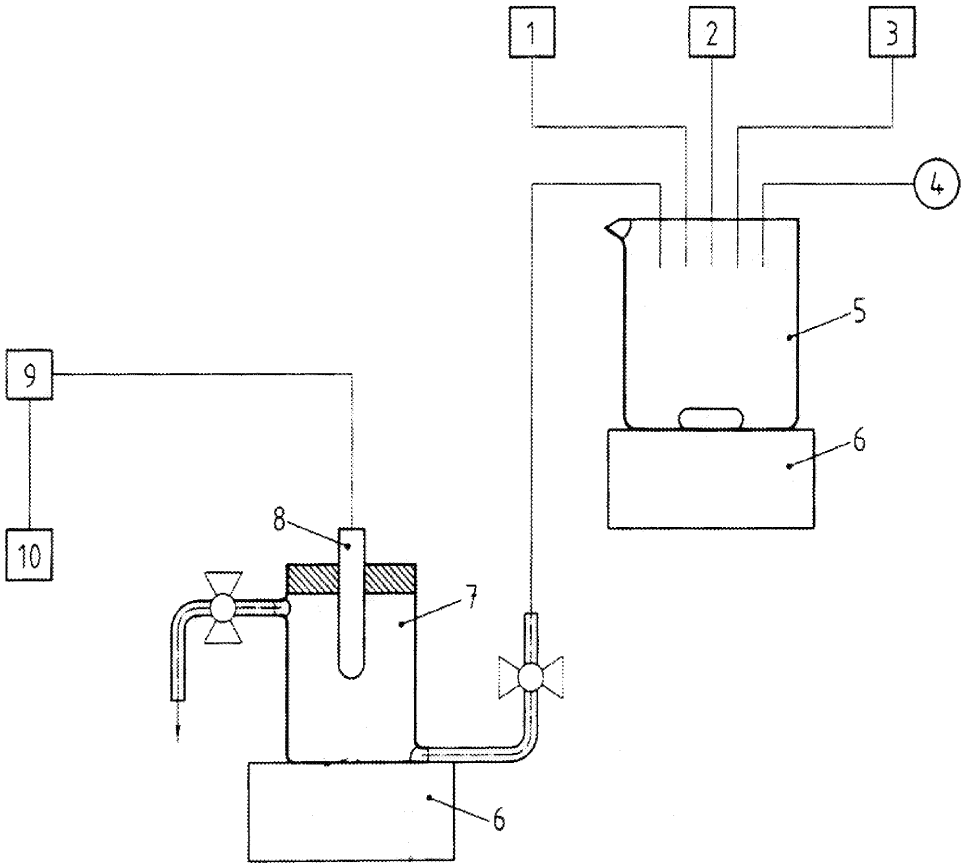
NOEC (täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼**M6**

2. liide

Joonis 1. **Mõõtesüsteemi näide.**



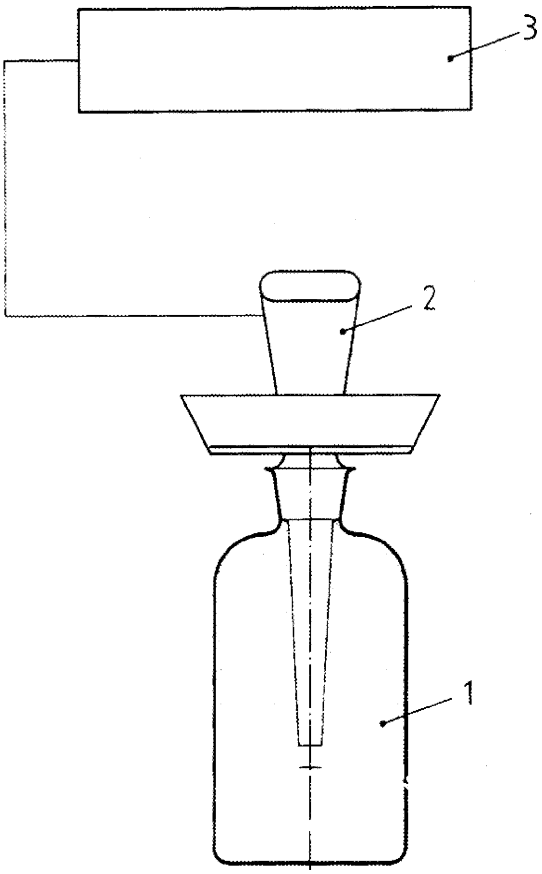
Selgitus:

1 – aktiivmuda	6 – magnetsegisti
2 – kunstlik sööde	7 – hapnikusisalduse mõõtmise kamber
3 – uuritav kemikaal	8 – hapnikuelektrood
4 – õhk	9 – hapnikusisalduse mõõtmise seade
5 – segamisnõu	10 – salvestusseade

▼**M6**

3. liide

Joonis 2. **BHT pudelil põhineva mõõtesüsteemi näide.**



Selgitus:

1 – katsenõu

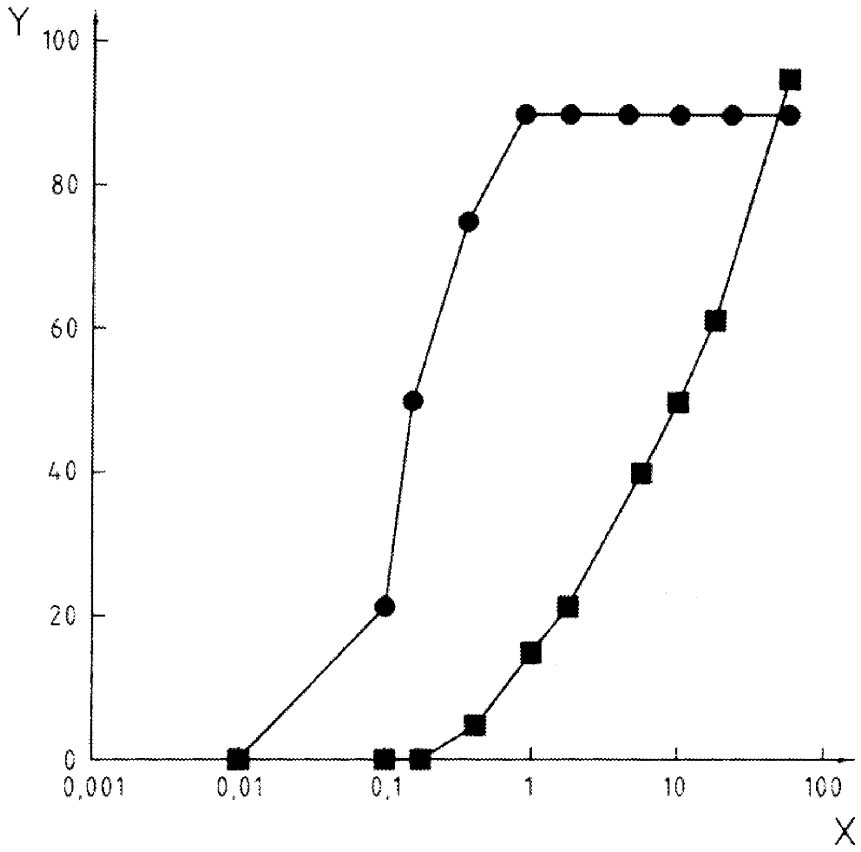
2 – hapnikuelektrood

3 – hapnikusisalduse mõõtmise seade

▼**M6**

4. liide

Joonis 3. **Pärssumiskõverate näide.**



Selgitus:

X – 3,5-diklorofenooli sisaldus (mg/l)

Y – pärssumine (%)

■ – heterotroofse hingamise pärssumine nitrifitseeriva muda kasutamisel

● – nitrifitseerimise pärssumine nitrifitseeriva muda kasutamisel.

▼B

C.12. **BIODEGRADATSIOON**

MODIFITSEERITUD SCAS TEST

1. **MEETOD**

1.1. SISSEJUHATUS

Meetodi eesmärk on hinnata veeslahustuvate, mittelenduvate orgaaniliste ainete võimalikku lõpp-biodegra-deerumist kokkupuutel suhteliselt suurte mikroorganismide kontsentratsioonidega pika aja jooksul. Mikroorganismide elusolek säilitatakse selles perioodis, toites aktiivmuda iga päev setitatud reovee lisamisega. (Nädalavahetuse vajaduste katmiseks võib reovett säilitada temperatuuril 4 °C. Teise võimalusena võib kasutada OECD kunstlikku reovett.)

Võimalik on füüsikalis-keemiline adsorptsioon suspendeeritud kuivainele, mida tuleks tulemuste interpreteerimisel arvestada (vt 3.2).

Seoses vedela faasi pika viibeaja perioodiga (36 tundi) ja vahepealse toitainete lisamisega ei jäljenda test neid tingimusi, mis tekivad reoveepuhastis. Erinevate uuritavate ainetega saadud tulemused viitavad sellele, et testi biodegradatsioonivõime on suur.

Testis tekitatud tingimused on äärmiselt soodsad uuritavat ühendit degradeerivate mikroorganismide valikuks ja/või adaptatsiooniks. (Protseduuri võib samuti kasutada aklimatiseeritud inokulaadi tekitamiseks, mida kasutada teistes testides.)

Selle meetodi puhul kasutatakse uuritava aine lõpliku biodegradatsiooni hindamiseks lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni määramist. LOS-määramine pärast hapestamist ja puhastamist on eelistatum meetod kui lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioonide erinevuse ($C_{üld} - C_{anorgaaniline}$) arvutamine.

Samaaegne spetsiifilise analüüsimeetodi kasutamine võib anda võimaluse aine esmase degradatsiooni hindamiseks (lähteühendi keemilise struktuuri kadumine).

Meetod on kasutatav ainult nende uuritavate orgaaniliste ainete puhul, mis testis kasutatud kontsentratsiooni juures

— on veeslahustuvad (vähemalt 20 mg lahustunud orgaanilist süsinikku/l);

— omavad tühist küllastatud aururõhu väärtust;

— ei ole bakterite suhtes pärssiva toimega;

— ei adsorbeeru oluliselt testisüsteemi;

— ei kao katselahusest vahu tekke tulemusena.

Määrata tuleb orgaanilise süsiniku sisaldus uuritavas materjalis.

▼B

Uuringutulemuste tõlgendamisel on kasulik teada uuritava materjali põhikomponentide kohta käivat teavet. Seda eelkõige juhtudel, kui tulemused on väga väikesed või alammääralised.

Informatsioon aine toksilisuse kohta mikroorganismidesse võib olla kasulik väikeste tulemuste interpreteerimisel ja katseks sobiva kontsentratsiooni valimisel.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

C_T = uuritava ühendi kontsentratsioon orgaanilise süsiniku juuresolekul või setitatud reoveele lisamisel aeratsiooniperioodi alguses (mg/l),

C_t = lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon, mis on sedastatud uuringu supernatantvedelikus aeratsiooniperioodi lõpus (mg/l),

C_c = lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon, mis on sedastatud kontrolli supernatantvedelikus aeratsiooniperioodi lõpus (mg/l).

Selle meetodi puhul defineeritakse biodegradatsiooni orgaanilise süsiniku kadumisena. Biodegradatsiooni saab väljendada järgmiselt.

1. Iga päev lisatud ainekogusest eemaldatud D_{da} protsent:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

kus

D_{da} = degradatsioon/päevas lisamine.

2. Tiga päeva alguses olemasolevast ainekogusest eemaldatud D_{ssd} protsent:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

kus

D_{ssd} = degradatsioon/aine päeva alguses;

indeksid i ja (i+1) viitavad mõõtmispäevale.

Valem 2a on soovitatav, kui väljavoolu LOS erineb päevast päeva, mille juures aga valemit 2b võib kasutada, kui väljavoolu LOS püsib päevast päeva suhteliselt konstantsena.

▼B

1.3. VÕRDLUSAINED

Osadel juhtudel võib uue aine uurimisel olla kasu võrdlusainete kasutamisest. Siinjuures ei tooda aga ära spetsiifilisi võrdlusaineid.

Andmed ringtestides hinnatud ühendite kohta on äratoodud (vt liide 1) peamiselt nii, et meetodi kalibreerimist võib teha pidevalt ja teistsuguse meetodi kasutamisel on võimalik tulemusi omavahel võrrelda.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

Reoveepuhastist pärit aktiivmuda asetatakse (SCAS) seadmeosasse. Lisatakse uuritav ühend ja setitatud olmereovesi ning segu aereeritakse 23 tundi. Seejärel aereerimine peatatakse, lastakse mudal settida ja vedelik valatakse ära.

Aeratsioonikambrisse jäänud muda segatakse järgmise uuritava ühendi alikvoodi ja reoveega ning tsüklit korratakse.

Biodegradatsioon tehakse kindlaks lahustunud orgaanilise süsiniku sisalduse põhjal supernatantvedelikus. Saadud tulemust võrreldakse näitajaga, mis on saadud ainult setitatud reoveest võetud kontrollist.

Kui kasutatakse spetsiifilist analüüsimeetodit, saab mõõta biodegradatsioonist tingitud eellasmolekuli kontsentratsiooni muutusi (primaarne biodegradatsioon).

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Selle lahustunud orgaanilise süsiniku eemaldamisel põhineva meetodi korduvteostatavust ei ole veel kinnitatud. (Kui kaalutakse primaarset biodegradatsiooni, saadakse väga täpsed andmed materjalide kohta, mida ulatuslikult degradeeritakse.)

Käesoleva meetodi tundlikkuse määrab suures osas põhilahuse varieeruvus ning vähesemal määral lahustunud orgaanilise süsiniku määramise täpsus ja uuritava ühendi sisaldus vedelikus iga tsükli alguses.

1.6. KATSEPROTSEDUURI KIRJELDUS

1.6.1. *Ettevalmistused*

Iga uuritava aine ja kontrolli jaoks ühendatakse piisav arv puhtaid aeratsiooniseadmeid (alternatiivina võib kasutada originaalset 1,5 l SCAS testi seadmeosa) ja õhu sisselaske torusid (joonis 1). Katseseadmetesse suunatud suruõhk (puhastatud läbi puuvillase filtri) ei tohiks sisaldada orgaanilist süsinikku ja peaks olema eelnevalt küllastatud veega, et vähendada kadusid auramise tõttu.

Vedelikusegu proov, mis sisaldab 1–4 g suspendeeritud tahkeid osakesi/l saadakse peamiselt olmereovee puhastist pärit aktiivmudast. Iga aeratsiooniseadme kohta vajatakse ligikaudu 150 ml vedelikusegu.

▼B

Uuritava aine põhilahused valmistatakse destilleeritud vees; tavalisel juhul vajalik kontsentratsioon on 400 mg/l, kuna iga aeratsioonitsükli alguses annab orgaaniline süsinik uuritava ühendi kontsentratsiooniks 20 mg/l süsinikku, kui biodegradatsiooni ei teki.

Suuremad kontsentratsioonid on lubatud, kui toksilisus mikroorganismidele seda võimaldab.

Määratakse põhilahuste orgaanilise süsiniku sisaldus.

1.6.2. *Katsetingimused*

Katse tuleks teha temperatuuril 20–25 °C.

Kasutatakse suuri aeroobsete mikroorganismide kontsentratsioone (1–4 g/l suspendeeritud kuivainet) ja efektiivne viibeaja periood on 36 tundi. Süsinikku sisaldavat materjali reovee söötmes oksüdeeritakse ulatuslikult, tavaliselt kaheksa tundi alates iga aeratsioonitsükli algusest. Seejärel muda respireerib endogeenselt ülejäänud aeratsiooniperioodi, mille käigus ainuke olemasolev substraat on uuritav ühend, kui see ei ole juba täielikult metaboliseeritud. Need omadused kombineerituna igapäevase testi reinokuleerimisega (kui keskkonnana kasutatakse olmereovett), tagavad äärmiselt soodsad tingimused nii aklimatsiooniks kui ka ulatuslikuks biodegradatsiooniks.

1.6.3. *Katse käik*

Peamiselt olmereoveest pärit aktiivmudaga puhastist või laboriseadmest võetakse vedelikusegu proov ja seda hoitakse aeroobsetes tingimustes kuni laboris kasutamiseni. Iga aeratsiooniseade ja samuti kontrollseade täidetakse 150 ml vedelikuseguga (kui kasutatakse SCAS originaaltesti ühikut, tuleb kogus kümnekordistada) ja alustatakse aereerimist. 23 tunni pärast aeratsioon peatatakse ja mudal lastakse settida 45 minutit. Järjekorras avatakse kõik torude kraanid ja 100 ml supernatantvedeliku osad eemaldatakse. Setitatud olmereovee proov võetakse vahetult enne kasutamist ja 100 ml lisatakse igasse aeratsiooniühikusse jäänud muda kogusele. Alustatakse uuesti aereerimist. Selles staadiumis enam uuritavat materjali juurde ei lisata ja seadmeosadesse lisatakse toitelahusena üks kord päevas olemreovett kuni saadakse seismisel läbipaistev supernatandi vedelik. Tavaliselt läheb kuni kaks nädalat, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus supernatantvedelikus läheneks iga aeratsioonitsükli lõpus püsiväärtusele.

Selle perioodi lõpuks üksikud setitatud mudakogused segatakse kokku ja igasse seadmeossa lisatakse 50 ml saadud mudasegu.

Kontrollanumatesse lisatakse 95 ml setitatud reovett ja 5 ml vett ning katseanumatesse lisatakse 95 ml setitatud reovett koos 5 ml sobivat uuritavat ühendit sisaldava põhilahusega (400 mg/l). Aeratsiooni alustatakse uuesti ja jätkatakse 23 tundi. Mudal lastakse seejärel settida 45 minutit, vedelik valatakse pealt ära ja analüüsitakse sellest lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust.

Eespool kirjeldatud „täida-eemalda” -protseduuri korratakse iga päev kogu katse vältel.

▼B

Enne sadestamist võib olla vajalik anumate seinte puhastamine, et hoida ära tahkete osakeste kuhjumist üle vedelikunivoo. Ristkontaminatsiooni vältimiseks kasutatakse iga seadme jaoks eraldi kaabitsat või harja.

Ideaaljuhul tuleks lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust supernatantvedelikus määrata iga päev, kuigi lubatud on ka harvemad analüüsid. Enne analüüsimist filtreeritakse vedelikud läbi pestud 0,45 μn membraanfiltrite või tsentrifuugitakse. Membraanifiltrid on sobivad, kui on tagatud, et nad ei lase läbi süsinikku ega absorbeeri ainet filtratsiooni etapis. Tsentrifuugis asuva proovi temperatuur ei tohi ületada 40 °C.

Vähese või mittemääratava biodegradatsiooniga ühenditega tehtava katse pikkus on kindlaks määramata, kuid kogemuse põhjal peaks see üldiselt olema vähemalt 12 nädalat, kuid mitte kauem kui 26 nädalat.

2. **ANDMED JA HINDAMINE**

Lahustunud orgaanilise süsiniku väärtused katse- ja kontrollanumate supernatantvedelikus kujutatakse graafikul võrdluses ajaga.

Biodegradatsiooni saavutamisel läheneb uuritava aine osas sedastatud tase kontrolli puhul kindlaks tehtud näitajale. Kui kahe taseme vahel leitud erinevus püsib kolme järjestikuse mõõtmise puhul, tehakse veel selline arv edasisi mõõtmisi, et võimaldada andmete statistilist töötlust, ja arvutatakse uuritava ühendi protsentuaalne biodegradatsioon (D_{da} või D_{ssd}, vt 1.2).

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmist teavet:

— kogu teave, mis puudutab kasutatud reovett, seadmetüüpi, uuritava ainega seotud katsetulemusi, võrdlusainet, kui kasutati, ja põhilahust;

— temperatuur;

— eemaldamiskõver koos kirjeldusega, arvutamisviis (vt 1.2);

— kuupäev ja koht, kust võeti aktiivmuda ja reovee proovid, adaptatsiooni seisund, kontsentratsioon jne;

— kõikide uuringuprotseduuride muutuste teaduslik põhjendus;

— allkiri ja kuupäev.

▼B

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kuna sellisel meetodil uuritud aine ei ole täielikult biolagundatav, eemaldub LOS ainult biodegradatsiooni tõttu normaalsel juhul järk-järgult päevi ja nädalaid, v.a juhtudel, kui aklimatsioon on toimunud äkki (näidatud äkki kadumisena mõne nädala möödumisel).

Mõnikord võib olulist rolli mängida füüsikalis-keemiline adsorptsioon. See on näidatud juhul, kui esineb täielik või osaline lisatud LOS-eemaldamine alguses. Edasine käik sõltub sellistest faktoritest nagu adsorptsiooni ulatus ja suspendeeritud kuivaine sisaldus väljavoolu vees. Tavaliselt suureneb erinevus LOS-kontsentratsioonide vahel kontrollis ja proovi supernatantvedelikus järk-järgult algselt madalalt tasemelt ja see erinevus jääb seejärel uuele tasemele ülejäänud eksperimendiks, v.a aklimatisatsiooni korral.

Kui biodegradatsiooni (või osalise biodegradatsiooni) ja adsorptsiooni tuleb eristada, on vajalikud täiendavad katsed. Seda saab teha mitmel erineval viisil, kuid kõige usaldusväärsem on supernatantvedeliku või muda kasutamine inokulaadina baasuuringu raames (eelistatult respiromeetriline uuring).

Selles uuringus tuleks kõrgeid, adsorptsiooni teel mitteeemaldatavaid LOS-tulemusi pidada potentsiaalselt biolagundatavateks. Osaline adsorptsiooni teel mitteeemaldamine viitab sellele, et kemikaal allub vähemalt osalisele biodegradatsioonile.

LOS-eemaldamise madalate või null-näitajate põhjuseks võib olla mikroorganismide pärssimine uuritava aine poolt ja selle võib vallandada ka muda lõhustamine või kadu, mis tekitab häguse supernatandi. Testi tuleks korrata, kasutades uuritava aine madalamaid kontsentratsioone.

Spetsiifilise analüütilise meetodi või ^{14}C-märgistatud uuritava aine kasutamine võib anda suurema tundlikkuse. ^{14}C testi ühendi kasutamisel $^{14}CO_2$ sedastamine kinnitab biodegradatsiooni teket.

Kui tulemusi antakse ka primaarse biodegradatsiooni kohta, tuleks võimaluse korral anda selgitus keemilise struktuuri muutustele, mis viib uuritava eellasühendi vastusreaktsiooni kadumisele.

Analüütilise meetodi kinnitus tuleb edastada koos vastusega, mis saadi puhta katsekeskkonna kohta.

4. **VIITED**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

▼B

1. liide

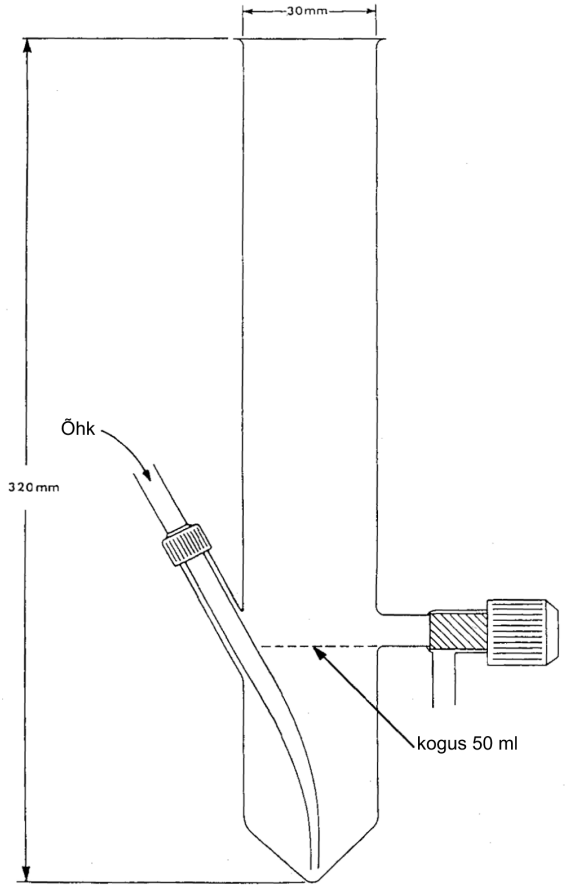
SCAS test: tulemuste näidised

Aine	C_T (mg/l))	C_t–C_c (mg/l)	Protsentuaalne biodegradatsioon D_{da}	Katse kestus (päevades)
4-atsetüülaminobenseensulfonaat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropüleenbenseensulfonaat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenool	16,9	0,8	95,3	40
Dietüleenglükool	16,5	0,2	98,8	40
Aniliin	16,9	1,7	95,9	40
Tsüklopentaantetrakarboksülaat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

2. liide

Uuringuseadme näidis



▼M7

C.13. BIOAKUMULEERUMINE KALADES: KOKKUPUUDE VEE JA TOIDU KAUDU

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 305 (2012). Katsemeetodi muutmisel on kaks põhieesmärki. Esiteks soovitakse seda täiendada toidu kaudu bioakumuleerumist ([1]) käsitleva meetodiga, mis sobib vees väga vähe lahustuvate ainete võimaliku bioakumuleerumise tuvastamiseks. Teiseks soovitakse välja töötada katsemeetod, mille puhul loomade heaolu huvides kasutatakse võimaluse korral vähem kalu ja mis on kulutõhusam.

Konsolideeritud katsemeetodi C.13 (1) vastuvõtmisele järgnenud aastatel on tehtud katseid paljude ainetega ja saadud märkimisväärseid kogemusi nii laborites kui ka reguleerivates asutustes. See on viinud veendumusele, et meetodi keerukust saab konkreetsetele kriteeriumidele vastavuse korral (vt punkt 88) vähendada ning on võimalik kasutada astmelist lähenemisviisi. Samuti ilmneb kogemustest, et sellised bioloogilised tegurid nagu kalade kasv ja lipiidisisaldus võivad tulemustele tugevat mõju avaldada ja neid võib olla vaja arvesse võtta. Peale selle on jõutud arusaamisele, et vees väga raskesti lahustuvate ainetega katsete tegemine ei pruugi olla tehniliselt teostatav. Lisaks võib vees väga vähe lahustuvate ainete puhul olla veekaudne kokkupuude veekeskkonnas väiksema tähtsusega kui kokkupuude toidu kaudu. Sellest tulenevalt on välja töötatud katsemeetod, mille puhul kalade kokkupuude toimub toidu kaudu (vt punktid 7–14 ja alates punktist 97). Toidu kaudu kokkupuudet käsitleva katsemeetodi valideerimine (laboritevaheline võrdlusuuring) viidi läbi 2010. aastal (51).

Peamised muudatused hõlmavad järgmist.

— Kui on tõenäoline, et biokontsentratsioonitegur (BCF) on katsekontsentratsioonist sõltumatu, võib ainult ühe katsekontsentratsiooni kasutamist katses lugeda piisavaks.

— Teatavatele kriteeriumidele vastavuse korral on võimalik kasutada veekaudse kokkupuute määramiseks minimeeritud katseplaani, mille puhul proovivõtupunktide arv on väiksem.

— Tuleks määrata kalade lipiidisisaldus, et biokontsentratsioonitegurit oleks võimalik väljendada lähtuvalt lipiidisisaldusest 5 %.

— Statsionaarset olekut iseloomustava biokontsentratsiooniteguri hindamise kõrval on pandud suuremat rõhku biokontsentratsiooniteguri kineetika hindamisele (kui see on võimalik).

— Teatava rühma ainete puhul nähakse ette toidukaudse kokkupuute katse juhtudel, mil seda peetakse asjakohasemaks kui veekaudse kokkupuute katset.

— Tuleks määrata kalade mass, et BCF_k-d oleks võimalik korrigeerida kasvust tingitud lahjenemise suhtes.

Enne mis tahes bioakumuleerumiskatse alustamist peaksid uuritava aine kohta olema teada järgmised andmed:

a) analüüsimeetodi tundlikkus uuritava aine ja selle võimalike metaboliitide sisalduse määramisel kudedes, samuti vees või toidus (vt punkt 65);

b) lahustuvus vees (katsemeetod A.6; (2)); see tuleks määrata vastavalt meetodile, mis on asjaomase (hinnangulise) lahustuvusvahemiku jaoks sobiv ja tagab usaldusväärse tulemuse. Hüdrofoobsete ainete puhul kasutatakse üldjuhul kolonnist elueerimisel põhinevat meetodit;

([1]) Mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites.

▼M7

c) süsteemi *n*-oktanool/vesi iseloomustav jaotuskoefitsient K_{OW} ([1]) (katsemeetodid A.8 (4), A.24 (5) ja A.23 (6)) või muu asjakohane teave jaotumisega seotud omaduste kohta (näiteks sorbeerumine lipiididele – K_{OC}); see tuleks määrata vastavalt meetodile, mis on K_{OW} asjaomase (hinnangulise) vahemiku jaoks sobiv ja tagab usaldusväärse tulemuse. Hüdrofoobsete ainete puhul kasutatakse üldjuhul aeglasel segamisel põhinevat meetodit (katsemeetod A.23 (6));

d) aine püsivus vees (hüdrolüüs – katsemeetod C.7 (7));

e) aine püsivus toidus (kui konkreetselt on valitud lähenemisviis, mis põhineb toidukaudse kokkupuute hindamise meetodil);

f) fotokeemilist muundumist käsitlevad andmed, mis on katses kasutatavaid kiirgustingimusi silmas pidades asjakohased (8);

g) pindpinevus (ainete puhul, mille log K_{OW}-d ei ole võimalik määrata) (katsemeetod A.5 (9));

h) aururõhk (katsemeetod A.4 (10));

i) vajaduse korral kõik andmed aine biootilise ja abiootilise vees lagunemise kohta, näiteks (kuid mitte ainult) kiire biolagundatavuse kohta (katsemeetod C.4, II–VII osa (11), ja katsemeetod C.29 (12));

j) vajaduse korral teave metaboliitide kohta: struktuur, log K_{OW}, teke ja lagundatavus;

k) happe dissotsiatsioonikonstant (pK_a) ainete puhul, mis võivad ioniseeruda. Kui see on katsealuse kalaliigi puhul vastuvõetav, tuleks vajaduse korral katses kasutatava vee pH-d reguleerida, et tagada katses aine esinemine ioniseerimata kujul.

Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse valitud kokkupuuteviisist ja proovivõtukorrast sõltumatut korda aine võimaliku kalades bioakumuleerumise hindamiseks. Ehkki kindlasti tuleks eelistada läbivoolurežiimi, on katses lubatud kasutada ka poolstaatilist režiimi, kui nõuetekohasuse kriteeriumid (vt punktid 24 ja 113) on täidetud. Toidukaudse kokkupuute hindamisel ei pea kasutama läbivoolusüsteemi, et säilitada uuritava aine sisaldust vees, kuid see hõlbustab lahustunud hapniku sisalduse hoidmist vajalikul tasemel ning aitab tagada vee puhtust ja kõrvaldada näiteks eritiste mõju.

Käesolevas katsemeetodis esitatakse valitud konkreetsest meetodist sõltumatu piisavalt üksikasjalik katse läbiviimise kirjeldus, ent jäetakse samas piisavalt vabadust katseplaani kohandamiseks vastavalt konkreetse labori tingimustele ja konkreetse uuritava aine omadustele. Veekaudse kokkupuute katset on kõige asjakohasem kasutada püsivate orgaaniliste ainete puhul, mille log K_{OW} väärtus on vahemikus 1,5–6,0 (13), kuid seda võib kasutada ka väga hüdrofoobsete ainete puhul, mille log K_{OW} > 6,0, kui on võimalik tõendada, et uuritav aine on teataval kontsentratsioonil vees täielikult lahustunud ja selline kontsentratsioon on püsiv. Kui ei ole võimalik tõendada, et uuritava aine sisaldus vees on püsiv, ei ole veekaudse kokkupuute katse asjakohane ning oleks vaja kasutada lähenemisviisi, mis põhineb kalade kokkupuutel ainega toidu kaudu (ehkki toidukaudse kokkupuute katse tulemuste tõlgendamine ja kasutamine võib sõltuda konkreetsest õigusraamistikust). Orgaaniliste ainete puhul, mille log K_{OW} on kuni umbes 9,0, võib biokontsentratsiooniteguri (BCF, vahel tähistatud ka kui K_B) hinnangulise väärtuse leidmiseks kasutada võrrandit, mille on avaldanud Bintein *et al.* (14). Selliste väga

([1]) Mõnikord kasutatakse tähist P_{OW}; selle määramiseks kasutatakse peatükis A.8 (4) kirjeldatud loksutamismeetodit, peatükis A.24 (5) kirjeldatud HPLC-põhist meetodit või peatükis A.23 (6) kirjeldatud aeglasel segamisel põhinevat meetodit. Mõnikord kasutatakse log K_{OW} määramiseks generaatorkolonnil põhinevat meetodit. Selle meetodi kasutamist kirjeldavate uuringute arv on piiratud; seda on peamiselt kasutatud klooritud bifenüülide ja dibensodioksiinide puhul (nt Li ja Doucette, 1993) (3). Ainete puhul, mis võivad ioniseeruda, peaks log K_{OW} väärtus viitama ioniseerumata vormile.

▼M7

hüdrofoobsete ainete biokontsentratsiooniteguri hinnanguline väärtus võib olla suurem kui laborikatsetes eeldatavalt saadav biokontsentratsioonitegur statsionaarses olekus (BCF_{SS}), eriti juhul, kui kõnealuse hinnangulise väärtuse leidmiseks kasutatakse lihtsat lineaarset mudelit. Võimalikku bioakumuleerumist iseloomustavad parameetrid hõlmavad aine omastamise kiiruskonstanti (k_1), aine kao kiiruskonstante, sealhulgas puhastumise kiiruskonstanti (k_2), biokontsentratsioonitegurit statsionaarses olekus (BCF_{SS}), kineetilist biokontsentratsioonitegurit (BCF_K) ja toidu kaudu biokuhjumise tegurit (BMF) ([1]).

Uuritava aine radioaktiivne märgistamine võib hõlbustada vee-, toidu- ja kalaproovide analüüsimist ja selle abil võib kindlaks teha, kas metaboliitide tuvastamine ja kvantifitseerimine on vajalik. Kui mõõdetakse üksnes radioaktiivsete jääkide üldsisaldust (näiteks põletamise või kudede solubiliseerimise abil), leitakse BCF või BMF lähteaine, kõikide allesjäänud metaboliitide ja assimileerunud süsiniku summaarse sisalduse põhjal. Radioaktiivsete jääkide üldsisaldusel põhinevad BCFi või BMFi väärtused ei pruugi seepärast olla otseselt võrreldavad üksnes lähteaine suhtes spetsiifilise keemilise analüüsi põhjal saadud BCFi või BMFi väärtustega. Radioaktiivse märgistamise uuringutes võib enne analüüsimist kasutada selliseid lahutamismeetodeid nagu õhekihikromatograafia, HPLC ([2]) või gaaskromatograafia, et määrata BCF või BMF lähteaine põhjal. Lahutamismeetodi kasutamise korral tuleks tuvastada ja kvantifitseerida nii lähteaine kui ka asjakohased metaboliidid ([3]) (vt punkt 65), kui BCFi või BMFi arvutamisel soovitakse aluseks võtta mitte radioaktiivselt märgistatud jääkide üldsisaldus, vaid lähteaine sisaldus kalas. Samuti on võimalik ühendada bioakumuleerumise uuring kala metabolismi või aine *in vivo* jaotumise uuringuga ning tuvastada ja analüüsida kudedes esinevaid jääke. Võimaliku metabolismi prognoosimiseks võib kasutada sobivaid vahendeid (nt OECD QSAR-meetodite pakett (15) ja omandiõigusega kaitstud QSAR-programmid).

Selle üle otsustamisel, kas teha veekaudse või toidukaudse kokkupuute katse ja millise katseplaani alusel, tuleks lähtuda punktis 3 kirjeldatud aspektidest ja kaaluda neid asjaomase õigusraamistiku kontekstis. Näiteks tuleks ainete puhul, mille log K_{OW} on suur, kuid mille lahustuvus vees on olemasolevate analüüsimeetodite tundlikkust silmas pidades siiski arvestatav, kaaluda kõigepealt veekaudse kokkupuute katse tegemist. On siiski võimalik, et teave selliste hüdrofoobsete ainete vees lahustuvuse kohta ei ole põhjalik, mistõttu enne konkreetse katsemeetodi kasutamise üle otsuse langetamist tuleks uurida, kas on võimalik valmistada asjaomase aine püsiva, mõõdetava sisaldusega vesilahus (püsiv emulsioon ei ole lubatud), mida saaks kasutada veekaudse kokkupuute katses (16). Ei ole võimalik anda täpseid suuniseid sobiva katsemeetodi valimiseks lähtuvalt vees lahustuvuse ja süsteemis oktanool/vesi täheldatava jaotuskoefitsiendi piirkriteeriumidest, kuna eespool kirjeldatud põhjustel võivad muud tegurid (analüüsimeetod, lagunemine, adsorptsioon jne) avaldada märkimisväärset mõju katsemeetodi kohaldatavusele. Siiski võib öelda, et selliste ainete puhul, mille log K_{OW} väärtus on üle 5 ja vees lahustuvus alla ~ 0,01–0,1 mg/l, võib veekaudse kokkupuute hindamine muutuda üha raskemaks.

Tuleks kaaluda ka muid tegureid, mis võivad mõjutada katsemeetodi valikut, sealhulgas aine võimalikku adsorbeerumist katsenõudele ja -seadmetele, selle püsivust vesilahuses, võrrelduna püsivusega kalasöödas (17, 18), jne.

Teave selliste praktiliste aspektide kohta võib olla kättesaadav muudest veekaudset kokkupuudet käsitlevatest lõpuleviidud uuringutest. Täiendavat teavet bioakumuleerumise uuringute teostamisega seotud aspektide hindamise kohta võib leida kirjandusest (nt viide 19).

Ainete puhul, mille lahustuvus või kontsentratsiooni püsivus vees ja sellise kontsentratsiooni mõõtmine ei sea mingeid piiranguid veekaudse kokkupuute meetodi kasutamisele, tuleb aine võimaliku biokontsentreerumise hindamisel eelistada seda meetodit. Igal juhul tuleks veenduda, et veekaudsel kokkupuutel kasutatav(ad) kontsentratsioon(id) on aine katsekeskkonnas lahustuvuse vahemikus.

([1]) Mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites.
([2]) HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia.
([3]) Mõnes õigusraamistikus võib metaboliitide analüüsimine olla kohustuslik, kui on täidetud teatavad tingimused (vt punkt 65).

▼M7

Lahustunud uuritava aine püsiva sisalduse tagamiseks võib kasutada eri meetodeid, mis põhinevad näiteks põhilahuste kasutamisel või passiivsel doseerimissüsteemil (nt kolonnist elueerimise meetod), tingimusel, et on võimalik tõendada, et sealjuures säilitatakse püsiv kontsentratsioon ja punktis 27 esitatud soovituste kohane katsekeskkond ei muutu.

Väga hüdrofoobsete ainete puhul (log K_{OW} > 5 ja lahustuvus alla ~ 0,01–0,1 mg/l) võib veekaudse kokkupuute hindamine muutuda üha raskemaks. Sellega seotud piirangud võivad tuleneda asjaolust, et aine sisaldust vees ei ole võimalik hoida piisavalt püsivana (nt kokkupuutekatses kasutatavate nõude klaaspinnale sorbeerumise või kiire kalades omastamise tõttu), või sellest, et vesilahuses kasutatavad kontsentratsioonid on nii väikesed, et on võrreldavad analüütilise määramispiiriga või jäävad sellest allapoole ([1]). Selliste väga hüdrofoobsete ainete puhul soovitatakse kasutada toidukaudse kokkupuute meetodit, kui see on kooskõlas asjaomase õigusraamistikuga ja riskihindamise aluseks olevate vajadustega.

Pindaktiivsete ainete puhul tuleks kaaluda, kas veekaudse biokontsentreerumise katse on aine omadustest lähtuvalt teostatav; toidukaudse kokkupuute katse on selliste ainete puhul tõenäoliselt asjakohasem. Pindaktiivsed ained vähendavad pindpinevust kahe vedeliku piirpinnal. Tänu nende amfifiilsusele (st nad sisaldavad nii hüdrofiilset kui ka hüdrofoobset osa) kogunevad need ained piirpinnale, näiteks vee ja õhu või vee ja toidu piirpinnale või klaasseinale, see aga takistab nende sisalduse määramist vees.

Toidukaudse kokkupuute katse võimaldab hoiduda mõnest kokkupuutega seotud probleemist keerukate segude puhul, mille koostisainete lahustuvus vees on erinev, kuna võrreldaval tasemel kokkupuute saavutamine kõikide segu koostisainetega on sellises katses tõenäolisem kui veekaudse kokkupuute meetodi puhul (vt viide 20).

Tuleks märkida, et toidukaudse kokkupuute puhul leitakse biokontsentratsiooniteguri (BCF) asemel biokuhjumistegur (BMF) ([2]) On välja töötatud lähenemisviisid kineetilise biokontsentratsiooniteguri (BCF_K) hinnangulise väärtuse leidmiseks toidukaudse kokkupuute katses saadud andmete põhjal (nagu on kirjeldatud 8. liites), kuid selliste lähenemisviiside kasutamisel tuleks olla ettevaatlik. Kõnealuste lähenemisviiside puhul lähtutakse üldjuhul esimest järku reaktsiooni kineetikast ja need on kohaldatavad üksnes teatud kindlatesse rühmadesse kuuluvate ühendite puhul. On ebatõenäoline, et selliseid lähenemisviise on võimalik kohaldada pindaktiivsete ainete puhul (vt punkt 12).

Veekaudse kokkupuute määramisel tuleks loomade arvu ja/või ressursside vähendamiseks ette nähtud minimeeritud katseplaani, mille puhul proovivõtupunktide arv on väiksem (vt alates punktist 83), kohaldada üksnes juhul, kui on põhjust eeldada, et asjaomase aine omastamine ja sellest puhastumine toimub ligikaudu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale (st üldjuhul on tegu ioniseerumata orgaaniliste ainetega; vt punkt 88).

C.13 – I: **VEEKAUDSEL KOKKUPUUTEL BIOKONTSENTREERUMISE KATSE KALADEGA**

KATSE PÕHIMÕTE

Katse hõlmab kahte etappi: kokkupuutumise (omastamise) etapp ja kokkupuutejärgne (puhastumise) etapp. Omastamisetapis viiakse rühm ühe liigi kalu kokkupuutesse uuritava ainega, mis esineb aine omadustest sõltuvalt ühel või mitmel valitud kontsentratsioonil (vt punkt 49). Seejärel viiakse kalad puhastumisetapiks keskkonda, mis ei sisalda uuritavat ainet. Puhastumisetapp on alati vajalik, välja arvatud juhul, kui omastamisetapis omastatakse ainet tühises koguses. Uuritava

([1]) Üldjuhul peaks omastamisetapis mõõdetav aine sisaldus vees olema vähemalt ühe suurusjärgu võrra suurem kui määramispiir, et katse puhastumisetapis oleks võimalik teha mõõtmisi mitme organismist kõrvaldamise poolväärtusaja vältel.

([2]) Mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites.

▼M7

aine kontsentratsiooni kalas või kala pinnal (või kala teatavates kudedes) jälgitakse katse kummagi etapi kestel. Peale ainega kokkupuutuva rühma kasutatakse kontrollrühma, milles kalu hoitakse identsetes tingimustes, kuid ilma uuritava aineta, et oleks võimalik võrrelda biokontsentreerumise katses täheldatud võimalikku ebasoodsat mõju vastava kontrollrühma näitajatega ja teha kindlaks uuritava aine taustsisaldus ([1]).

Veekaudse kokkupuute katses on omastamisetapi kestus tavaliselt 28 päeva. Seda kestust võib vajaduse korral pikendada (vt punkt 18) või ka lühendada, kui on tõendatud, et statsionaarne olek saavutatakse varem (mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites). Omastamisetapi kestust ja statsionaarse oleku saavutamiseks vajalikku aega saab hinnata 5. liites esitatud võrrandite abil. Seejärel algab puhastumisetapp, mille vältel kalad ei puutu enam kokku uuritava ainega; selleks viiakse kalad üle puhtasse nõusse, mis sisaldab sama katselahust, kuid ilma uuritava aineta. Võimaluse korral arvutatakse biokontsentratsioonitegur, soovitatavalt nii kalades mõõdetud kontsentratsiooni (C_f) ja vees mõõdetud kontsentratsiooni (C_w) suhtarvuna statsionaarses olekus (BCF_{SS}; mõiste määratlus on esitatud 1. liites) kui ka kineetilise biokontsentratsioonitegurina (BCF_K; mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites), mis väljendab omastamise kiiruskonstandi (k_1) ja puhastumise kiiruskonstandi (k_2) suhet ning mille puhul eeldatakse esimest järku reaktsiooni kineetikat ([2]).

Kui 28 päeva jooksul ei saavutata statsionaarset olekut, võib arvutada BCFi kineetilise lähenemisviisi abil (vt punkt 38) või pikendada omastamisetappi. Kui statsionaarse oleku saavutamiseks vajalik omastamisetapp on ebamõistlikult pikk (vt punktid 37 ja 38 ning 5. liide), tuleks eelistada kineetilist lähenemisviisi. Teise võimalusena tuleks väga hüdrofoobsete ainete puhul kaaluda toidukaudse kokkupuute katse tegemist ([3]), kui see on kooskõlas asjaomase õigusraamistikuga.

Omastamise kiiruskonstant, puhastumise (kao) kiiruskonstant (või keerulisemate mudelite puhul konstandid), biokontsentratsioonitegur (statsionaarses olekus ja/või kineetiline) ja võimaluse korral iga nimetatud parameetri usalduspiirid arvutatakse mudelist, mis kirjeldab kõige paremini uuritava aine mõõdetud kontsentratsioone kalades ja vees (vt 5. liide).

Kalade kehamassi suurenemine katse vältel põhjustab uuritava aine sisalduse vähenemise kasvavates kalades (nn kasvust tingitud lahjenemine), mistõttu kineetilise BCFi väärtust alahinnatakse juhul, kui seda ei korrigeerita kasvu suhtes (vt punktid 72 ja 73).

BCF põhineb aine üldsisaldusel kalades (st kalade summaarsel märgmassil). Eriotstarbel võib siiski kasutada ka kindlaksmääratud kudesid või organeid (näiteks lihaskude, maks), kui kalad on piisavalt suured, või jagada kala söödavaks (filee) ja mittesöödavaks (sisikond) osaks. Kuna paljude orgaaniliste ainete biokontsentreerumise määra ja hüdrofoobsuse vahel on selge seos, on vastav seos ka uuritavate kalade lipiidisisalduse ja selliste ainete täheldatava biokontsentreerumise vahel. Seega tuleks kõnealuste väga lipofiilsete ainetega (log K_{OW} > 3) tehtavates katsetes sellest asjaolust tuleneva tulemuste varieeruvuse vähendamiseks kasutada biokontsentreerumise väljendamiseks peale katses otseselt saadud

([1]) Enamiku uuritavate ainete puhul ei tohiks aine ideaaljuhul olla kontrollrühma vees tuvastatav. Taustsisaldus peaks olema asjakohane üksnes looduslikult esinevate materjalide (nt mõned metallid) ja keskkonnas laialdaselt levinud ainete puhul.

([2]) Kui on selge, et tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikaga, tuleks kasutusele võtta keerukamad mudelid (vt viited 5. liites) ja küsida nõu biostatistikult.

([3]) Aine omastamist võib piirata väike kokkupuutekontsentratsioon, mis tuleneb vähesest vees lahustuvusest biokontsentreerumise katses, samas kui toidukaudse kokkupuute katses on võimalik saavutada oluliselt suurem kokkupuutekontsentratsioon.

▼M7

väärtuse ka normaliseeritud väärtust, mille aluseks on võetud kala lipiidisisaldus 5 % (terve kala märgmassist). See on vajalik selleks, et eri ainete ja/või katsealuste liikidega saadud tulemusi oleks võimalik omavahel võrrelda. Valitud lipiidisisaldus 5 % on laialdaselt kasutusel, kuna see väljendab käesolevas katsemeetodis tavapäraselt kasutatavate kalade keskmist lipiidisisaldust (21).

TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Peale sissejuhatuses punktis 3 kirjeldatud uuritava aine omaduste hõlmab nõutav teave ka aine mürgisust katses kasutatavale kalaliigile, soovitatavalt asümptootilist (st ajast sõltumatut) LC_{50}, ja/või kaladega tehtud pikaajaliste katsete põhjal hinnatud mürgisust (nt katsemeetodid C.47 (22), C.15 (23) ja C.14 (24)).

Uuritava aine kvantitatiivse sisalduse määramiseks katselahustes ja bioloogilises materjalis peaks olema kättesaadav teadaoleva mõõtetäpsusega, kordustäpsusega ja tundlikkusega asjakohane meetod koos üksikasjaliku kirjeldusega proovi ettevalmistamise ja säilitamise kohta. Samuti peaks olema teada uuritava aine analüütiline määramispiir vees ja kalakudedes. Radioaktiivselt märgistatud uuritava aine kasutamise korral peaks see olema võimalikult puhas (soovitatavalt puhtusega > 98 %) ja peaks olema teada lisanditega seotud radioaktiivsuse protsentuaalne osakaal.

KATSE NÕUETEKOHASUS

Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised tingimused:

veetemperatuuri varieeruvus on väiksem kui ± 2 °C, kuna suured kõrvalekalded võivad mõjutada omastamise ja puhastumise puhul olulisi bioloogilisi parameetreid ning põhjustada loomadele stressi;

lahustunud hapniku sisaldus ei lange alla 60 % küllastuskontsentratsioonist;

uuritava aine kontsentratsiooni hoitakse omastamisetapi vältel kambrites vahemikus ± 20 % mõõtmistulemuste keskväärtusest;

uuritava aine sisaldus on väiksem kui selle lahustuvus vees; seejuures võetakse arvesse katses kasutatava vee võimalikku mõju tegelikule lahustuvusele ([1])

suremus või kahjuliku mõju või haiguse osakaal kontroll- ja katserühma kalade hulgas on katse lõpus väiksem kui 10 %; kui katset pikendatakse mitme nädala või kuu võrra, peaks suremus või kahjuliku mõju osakaal kummaski kalade rühmas olema väiksem kui 5 % kuus ja kokku maksimaalselt 30 %. Oluline erinevus katserühma(de)st ja kontrollrühmast analüüsimiseks võetud kalade kasvukiiruses võib viidata uuritava aine mürgisele toimele.

VÕRDLUSAINED

Teadaoleva biokontsentreerumise määraga ja aeglaselt metaboliseeruvate võrdlusainete kasutamine hõlbustab katsemeetodi kontrollimist, kui see on nõutav (näiteks kui laboris ei ole sellist katset varem läbi viidud või kui katsetingimused on muutunud).

([1]) Mitut koostisosa sisaldava aine, UVCB või segu puhul tuleks sobivate kokkupuutekontsentratsioonide kindlaksmääramisel lähtuda iga asjakohase koostisosa lahustuvusest vees.

▼M7

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

Tuleks jälgida, et katseseadmete mis tahes osade puhul ei kasutata materjale, mis võivad lahustuda, sorbeerida või leostuda ning avaldada kaladele kahjulikku mõju. Võib kasutada keemiliselt inertsest materjalist standardseid ristkülikukujulisi või silindrikujulisi mahuteid, mille mahutavus on kooskõlas biomassisisaldusega (vt punkt 43). Pehmeid plasttorusid tuleks kasutada võimalikult vähe. Kasutada tuleks polütetrafluoroetüleenist, roostevabast terasest ja/või klaasist torusid. Kogemustest nähtub, et suure adsorptsiooniteguriga ainete, näiteks sünteetiliste püretroidide puhul võib olla vaja kasutada silaanitud klaasi. Sellisel juhul tuleks seadmed pärast kasutamist ära visata. Enne katseorganismide viimist katsesüsteemi on soovitatav lasta süsteemil puutuda kokku katses kasutatavatel kontsentratsioonidel esineva uuritava ainega nii kaua, kui on vaja kokkupuutekontsentratsioonide püsivuse tõendamiseks.

Vesi

Üldjuhul kasutatakse katses looduslikku vett, mis peaks pärinema saastumata ja ühtlase kvaliteediga allikast. Püsiva ühtlase kvaliteedi tagamiseks võib siiski olla otstarbekam kasutada taastatud vett (st demineraliseeritud vett, millele on lisatud teadaolev kogus teatud kindlaid toitaineid). Lahjendusvesi – st vesi, millesse segatakse uuritav aine enne katsenõusse viimist (vt punkt 30) – peaks olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab valitud liigi kaladel kohanemis- ja katseperioodi vältel ellu jääda, ilma et neil täheldataks mingeid ebanormaalse välimuse või käitumise ilminguid. Ideaaljuhul tuleks tõendada, et katses kasutatava liigi kalad jäävad lahjendusvees ellu, kasvavad ja paljunevad (näiteks laborikultuuris või elutsüklit hõlmavas mürgisuskatses). Lahjendusvee kohta peaks teada olema vähemalt selle pH, karedus, tahkete osakeste üldsisaldus ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus () ning soovitatavalt ka ammooniumisisaldus, nitritisisaldus ja mereliikide puhul soolsus. Kalade heaolu seisukohalt olulised parameetrid ei ole lõpuni teada, kuid 2. liites on esitatud mitme koostisaine soovitatav maksimumkontsentratsioon mageda ja soolase katsevee puhul.

Lahjendusvesi peaks olema katseperioodi kestel püsiva kvaliteediga. Vee pH peaks olema katses alguses vahemikus 6,0–8,5 ning ei tohiks konkreetse katse ajal varieeruda rohkem kui ± 0,5 ühikut. Selle tagamiseks, et lahjendusvesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi ega põhjustaks näiteks uuritava ainega komplekside moodustumist või avaldaks negatiivset mõju kalade seisundile, tuleks kindlate ajavahemike järel, ent vähemalt katse alguses ja lõpus võtta analüüsimiseks veeproove. Kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskmetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} ja $SO4^{2-}$) ning pestitsiidide sisaldus (näiteks fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus), orgaanilise süsiniku üldsisaldus ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks iga kolme kuu järel. Kui on tõendatud, et vee kvaliteet on vähemalt ühe aasta jooksul püsiv, võib neid määramisi teha harvem (nt iga kuue kuu järel).

Lahjendusvee looduslik tahkete osakeste sisaldus ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus peaks olema võimalikult väike, et hoida ära uuritava aine adsorbeerumist orgaanilisele ainele, kuna see võib vähendada uuritava aine biosaadavust ja põhjustada BCFi väärtuse alahindamist. Vastuvõetav tahkete osakeste maksimumsisaldus on 5 mg/l (kuivaine, mis ei läbi 0,45 μm filtrit) ja orgaanilise

() Orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC) hõlmab nii tahketes osakestes esinevat orgaanilist süsinikku (POC) kui ka lahustunud orgaanilist süsinikku (DOC), st TOC = POC + DOC.

▼M7

süsiniku üldsisaldus 2 mg/l (vt 2. liide). Vajaduse korral tuleks lahjendusvett enne kasutamist filtrida. Katsealuste kalade (väljaheited) ja toidujääkide põhjustatud orgaanilise süsiniku sisalduse suurenemine peaks olema võimalikult väike (vt punkt 46).

Katselahused

Valmistatakse uuritava aine sobiva kontsentratsiooniga põhilahus. Põhilahus tuleks soovitatavalt valmistada lihtsalt uuritava aine segamise või loksutamisega lahjendusvees. Teise võimalusena on mõnel juhul asjakohane kasutada tahkest faasist desorbeerumisel põhinevat doseerimissüsteemi. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamine ei ole üldjuhul soovitatav (vt viide 25); sellise aine kasutamine sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks võib siiski olla vastuvõetav, kuid tuleks tagada, et seda kasutatakse võimalikult väikeses koguses ning ei ületata kriitilist mitsellitekke kontsentratsiooni (kui see on asjakohane). Lahustina võib kasutada atsetooni, etanooli, metanooli, dimetüülformamiidi ja trietüleenglükooli; dispergeeriva ainena on kasutatud Tween 80, metüültselluloosi kontsentratsioonis 0,01 % ja HCO-40. Lahusti kontsentratsioon lõplikus katsekeskkonnas peaks olema kõikides uuritava ainega rühmades sama (st uuritava aine kontsentratsioonist sõltumatu) ning ei tohiks ületada asjaomase lahusti puhul konkreetsetes katsetingimustes määratud mürgisusläve. Suurim lubatud sisaldus on 100 mg/l (või 0,1 ml/l). On ebatõenäoline, et kontsentratsioonis 100 mg/l esinev lahusti muudab oluliselt katsekeskkonnas saavutatavat uuritava aine lahustuvust (25). Lahustist ja uuritavast ainest tulenev muutus katses kasutatavas vees esineva orgaanilise süsiniku üldsisalduses peaks olema teada. Orgaanilise süsiniku üldsisaldus ei tohiks katsenõudes kogu katse kestel ületada uuritavast ainest ja lahusti või dispergeeriva aine kasutamise korral ([1]) sellisest ainest pärineva orgaanilise süsiniku sisaldust rohkem kui 10 mg/l (± 20 %) võrra. Orgaanilise aine sisaldus võib kaladega tehtavas läbivoolukatses oluliselt mõjutada lahuses vabalt esineva uuritava aine kogust, eelkõige väga lipofiilsete ainete puhul. Tahke faasi abil mikroekstraheerimine (vt punkt 60) võib anda olulist teavet ühendi seondunud fraktsiooni ja lahuses vabalt esineva fraktsiooni suhtarvu kohta; lahuses vabalt esinevat fraktsiooni käsitletakse biosaadava fraktsioonina. Uuritava aine sisaldus peaks lahusti või dispergeeriva aine kasutamisest olenemata olema väiksem kui uuritava aine lahustuvus katsekeskkonnas. Kergesti biolagundatavate lahustite kasutamisel tuleks olla ettevaatlik, kuna need võivad läbivoolukatses põhjustada bakterite kasvuga seotud probleeme. Kui põhilahuse valmistamine ilma lahusti või dispergeeriva aineta ei ole võimalik, tuleks kaaluda veekaudse kokkupuute katse asjakohasust toidukaudse kokkupuute katsega võrreldes.

Läbivoolukatsete puhul on katsekambrites rea eri kontsentratsioonide tekitamiseks vaja kasutada süsteemi, kus uuritava aine põhilahust lisatakse ja lahjendatakse pidevalt (nt dosaatorpumba, proportsionaalse lahjendamise seadme või küllastamissüsteemiga), või tahkest faasist desorbeerumisel põhinevat doseerimissüsteemi. Igas katsekambris olev lahus peaks soovitatavalt vahetuma päevas vähemalt viiekordses mahus. Soovitatakse kasutada läbivoolurežiimi, kuid kui see ei ole võimalik (näiteks kui see mõjub katseorganismidele kahjulikult), võib kasutada poolstaatilist meetodit, eeldusel, et nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud (vt punkt 24). Põhilahuste ja lahjendusvee voolukiirust tuleks kontrollida 48 tundi enne katset ja seejärel katse vältel vähemalt kord päevas. Kõnealuse kontrollimise käigus määratakse igas katsekambris ka seda läbiva lahuse voolukiirus ja veendutakse, et see ei varieeru ühes katsekambris ja katsekambrite vahel rohkem kui 20 %.

([1]) Ehkki lahusti või dispergeeriva aine kasutamine ei ole üldiselt soovitatav, tuleks sellise aine kasutamisel lisada sellest pärineva orgaanilise süsiniku kogus uuritavast ainest pärineva orgaanilise süsiniku kogusele, et hinnata orgaanilise süsiniku sisaldust katsenõudes.

▼M7

Liigi valimine

Liigi valimisel on olulised kriteeriumid kättesaadavus, sobiv suurus ja võimalus kalu laboritingimustes rahuldavalt pidada. Muud kriteeriumid kalaliigi valimisel on muuhulgas liigi tähtsus majanduslikust, ökoloogilisest ja vaba aja veetmise seisukohast, samuti võrdluseks sobiv tundlikkus, varasemad eduka kasutamise kogemused jne. Soovitatavad katseliigid on esitatud 3. liites. Võib kasutada ka muid liike, kuid selleks võib olla vaja kohandada katsemenetlust, et luua sobivad katsetingimused. Sellisel juhul tuleb liigi ja katsemeetodi valikut põhjendada. Üldiselt lühendab väiksema kalaliigi kasutamine statsionaarse oleku saavutamise aega, kuid lipiidisisalduse ja uuritava aine sisalduse nõuetekohaseks analüüsimiseks kalades võib olla vaja rohkem kalu (proove). Peale selle on võimalik, et eri katsetes ja eri liikidega saadud tulemuste võrdlemist raskendavad erinevused noorte ja vanemate kalade hingamiskiiruses ja metabolismis. Tuleks silmas pidada, et kui katse tehakse kalade arengujärgus, kus kasv on kiire (noorjärk), võib see raskendada andmete tõlgendamist.

Kalade pidamine (nii veekaudse kui ka toidukaudse kokkupuute jaoks)

Kalade lähtepopulatsioonil tuleks lasta kohaneda vähemalt kaks nädalat katsetemperatuuril olevas vees (vt punkt 28) ja neile tuleks anda kogu selle aja vältel piisavalt sööta (vt punkt 45). Vesi ja sööt peavad olema sama tüüpi kui katses kasutatavad vesi ja sööt.

Pärast 48 tunni pikkust harjumisperioodi registreeritakse surmajuhtumid ja kohaldatakse järgmisi kriteeriume:

— kui suremus on populatsioonis seitsme päeva jooksul suurem kui 10 %, jäetakse kogu partii kõrvale;

— kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul 5–10 %, lastakse kaladel kohaneda veel seitse päeva; kui kõnealuse järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, jäetakse kogu partii kõrvale;

— kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul väiksem kui 5 %, loetakse partii vastuvõetavaks.

Katses kasutatavatel kaladel ei tohi esineda nähtavaid haigusi ega kõrvalekaldeid. Kõik haiged kalad tuleks kõrvale jätta. Katsele eelneva kahe nädala vältel ja katse ajal ei tohiks kaladel haigusi ravida.

KATSE KÄIK

Eelkatse

Katse tingimuste optimeerimiseks võib olla kasulik teha eelkatse, et valida näiteks uuritava aine kontsentratsioon(id) ning omastamisetapi ja puhastumisetapi kestus või teha kindlaks, kas katse tegemine täismahus on vajalik. Eelkatse plaan peaks võimaldama saada eelkatsest vajalikud andmed. Võib kaaluda, kas BCFi leidmiseks võib piisata miinimumkatsest või on vaja teha täismahus uuring (miinimumkatse kohta vt punktid 83–95).

Kokkupuutetingimused

Omastamisetapi kestus

Omastamisetapi eeldatava kestuse võib leida lähtuvalt praktilisest kogemusest (nt varasema uuringu või struktuurilt sarnase ainega tehtud akumuleerumiskatse põhjal) või teatud kindlatest empiirilistest seostest, mis põhinevad uuritava aine teadaoleval vees lahustuvuse või süsteemis oktanool/vesi täheldataval jaotuskoefitsiendil (eeldusel, et omastamine toimub vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale; vt 5. liide).

▼M7

Omastamisetapp peaks vältama 28 päeva, välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et statsionaarne olek saavutatakse varem (mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites). Kõveral, mis väljendab kalades sisalduva uuritava aine kontsentratsiooni (C_f) sõltuvust ajast, saavutatakse statsionaarne olek siis, kui kõver muutub ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevaste intervallidega võetud kolmes järjestikuses proovis mõõdetud C_f väärtused ei erine üksteisest rohkem kui ± 20 % ning esimese ja viimase järjestikuse analüüsi vahelisel perioodil ei täheldata C_f olulist suurenemist. Koondproovide analüüsimise puhul on vaja teha vähemalt neli järjestikust analüüsi. Aeglaselt omastatavate ainete puhul on sobivam intervall seitse päeva. Kui 28 päeva jooksul ei saavutata statsionaarset olekut, kasutatakse BCFi arvutamiseks üksnes kineetilist lähenemisviisi, mille puhul ei eeldata statsionaarse oleku saavutamist, või pikendatakse omastamisetapi kestust ja tehakse täiendavaid mõõtmisi kuni statsionaarse oleku saavutamiseni või 60 päeva vältel, olenevalt sellest, kumb periood on lühem. Samuti peab uuritava aine sisaldus kalas olema omastamisetapi lõpus piisavalt suur, et võimaldada usaldusväärselt hinnata k_2 väärtust puhastumisetapis. Kui 28 päeva jooksul ei täheldata aine olulisel määral omastamist, võib katse lõpetada.

Puhastumisetapi kestus

Ainete puhul, mida saab kirjeldada esimest järku reaktsiooni kineetika abil, piisab aine sisalduse sobivaks vähenemiseks organismis (nt 95 % võrra) tavaliselt ajavahemikust, mis on poole lühem kui omastamisetapp (seda hinnangut on selgitatud 5. liites). Kui 95 % suuruse kao saavutamiseks vajalik ajavahemik on ebamõistlikult pikk ja ületab näiteks kaks korda omastamisetapi tavapärase kestuse (st on üle 56 päeva), võib kasutada lühemat perioodi (nt perioodi, mille lõpus on uuritava aine sisaldus alla 10 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest). Ainete puhul, mille omastamise ja millest puhastumise mudel on keerukam kui esimest järku reaktsiooni kineetikaga kirjeldatav üheosalise kala mudel, võib olla vaja kasutada pikemat puhastumisperioodi. Kui täheldatakse ja/või eeldatakse vastavust sellisele keerukale mudelile, soovitatakse kasutada biostatistiku ja/või farmakokineetika spetsialisti abi, et tagada koostatava katseplaani sobivus. Puhastumisetapi pikendamise korral võib proovivõtmiseks kasutatavate kalade arv osutuda piiravaks teguriks ja tulemusi võivad mõjutada kaladevahelised kasvuerinevused. Puhastumisetapi kestust mõjutab ka see, millise ajavahemiku jooksul on uuritava aine sisaldus kalas suurem kui aine analüütiline määramispiir.

Katsealuste kalade arv

Kalade arv katsekontsentratsiooni kohta valitakse nii, et igas proovivõtupunktis on võimalik võtta vähemalt neljast kalast koosnev proov. Kalad tuleks koondproovi koondada üksnes juhul, kui üksikute kalade analüüs ei ole teostatav. Kui kõvera lähendamisel (ja selle põhjal arvutatud parameetrite puhul) soovitakse saavutada suuremat täpsust või kui on vaja läbi viia metabolismiuuringud (näiteks lähteaine ja metaboliitide eristamiseks radioaktiivselt märgistatud uuritava aine puhul), peab kalade arv proovivõtupunkti kohta olema suurem. Lipiidisisaldus tuleks määrata samast bioloogilisest materjalist, mida kasutatakse uuritava aine sisalduse määramiseks. Kui see ei ole teostatav, võib olla vaja rohkem kalu (vt punktid 56 ja 57).

Kui kasutatakse täiskasvanud (st suguküpseid) kalu, ei tohiks need olla enne katset jõudnud kudemisetappi või hiljuti kudenud ega teha seda katse vältel. Ühtlasi tuleks märkida, kas katses kasutatakse isas- või emaskalu või kummastki soost kalu. Kummastki soost kalade kasutamise korral tuleks tagada, et dokumenteeritud sugudevahelised erinevused kasvus ja lipiidisisalduses on ebaolulised, eriti juhul, kui isas- ja emaskalad on eeldatavalt vaja koondada ühte proovi, et võimaldada aine ja/või lipiidisisalduse määramist.

▼M7

Iga katse jaoks valitakse sarnase kehamassiga kalad, nii et kõige väiksemate kalade mass oleks vähemalt kaks kolmandikku kõige suuremate kalade massist. Kõik kalad peaksid olema ühevanused ja pärinema ühest allikast. Kuna kalade mass ja vanus võivad BCFi väärtust oluliselt mõjutada (12), tuleks sellekohased üksikasjad täpselt registreerida. Soovitatavalt tuleks vahetult enne katse alustamist mõõta kalaparvest võetud osaproovi mass, et hinnata kalade keskmist massi (vt punkt 61).

Biomassisisaldus

Tuleks kasutada suurt veekogust ühe kala kohta, et katse alguses kalade lisamisest tingitud uuritava aine sisalduse vähenemine vees oleks minimaalne ja et hoida ära lahustunud hapniku sisalduse vähenemist. On oluline jälgida, et biomassisisaldus oleks katses kasutatava liigi jaoks sobiv. Kõikidel tavapärastel juhtudel on soovituslik lisatav kalade kogus 0,1–1,0 g (märgmass) liitri vee kohta päevas. Kui uuritava aine sisaldust on võimalik hoida vahemikus ± 20 % nõutavast sisaldusest ja lahustunud hapniku sisaldus ei lange alla 60 % küllastuskontsentratsioonist, võib kasutada ka suuremat biomassisisaldust (vt punkt 24).

Sobiva biomassisisalduse valimisel võetakse arvesse asjaomase kalaliigi tavapärast elupaika. Näiteks võivad veekogu põhjas elavad kalad vajada sama veekoguse juures suuremat akvaariumi põhjapinda kui pelaagilised liigid.

Söötmine

Kohanemis- ja katseperioodi vältel antakse kaladele sobivat teadaoleva lipiidisisalduse ja valkude üldsisaldusega sööta piisavas koguses, et hoida neid tervena ja säilitada nende kehamassi (teatav kasv on lubatud). Kaladele antakse kohanemis- ja katseperioodi jooksul sööta iga päev kindlaksmääratud koguses, mis sõltub kasutatavast liigist, katsetingimustest ja sööda kalorsusest (näiteks vikerforelli puhul umbes 1–2 % kehamassist päevas). Sööda kogus valitakse nii, et ei toimuks kiiret kasvu ega lipiidisisalduse olulist suurenemist. Söötmismäära samal tasemel hoidmiseks tuleks sööda kogus sobiva sagedusega, näiteks kord nädalas ümber arvutada. Sellise arvutuse jaoks võib kalade massi igas katsekambris hinnata asjaomasest kambrist viimati võetud proovis mõõdetud kalade massi põhjal. Kambrisse jäänud kalu ei kaaluta.

Toidujäägid ja väljaheited tuleks sifooni abil kõrvaldada katsekambrist iga päev varsti pärast söötmist (30 minuti kuni ühe tunni möödudes). Kambreid tuleks hoida kogu katse vältel võimalikult puhtana, et orgaanilise aine sisaldus oleks võimalikult väike (vt punkt 29), kuna orgaaniline süsinik võib piirata uuritava aine biosaadavust (12).

Kuna sööt valmistatakse tihti kalajahust, tuleks tagada, et sööt ei mõjuta katsetulemusi ega avalda kahjulikku mõju, näiteks tingituna selles sisalduvatest pestitsiidi(jääki)dest, raskmetallidest ja/või uuritavast ainest.

Valgus ja temperatuur

Soovitatav valgustusperiood on 12–16 tundi ja veetemperatuur (± 2 °C) peaks olema katseliigi jaoks sobiv (vt 3. liide). Kasutatava valguse liik ja omadused peaksid olema teada. Tuleks olla ettevaatlik, et hoida ära uuritava aine võimalikku fotokeemilist muundumist katses kasutatavates valgustustingimustes. Tuleks kasutada sobivat valgusallikat, mille puhul hoitakse ära kalade kokkupuude mittelooduslike fotokeemilise muundumise saadustega. Mõnel juhul võib olla asjakohane kasutada filtrit, mis peab kinni ultraviolettkiirguse lainepikkusega alla 290 nm.

▼M7

Katsekontsentratsioonid

Käesolev katsemeetod töötati algselt välja mittepolaarsete orgaaniliste ainete jaoks. Selliste ainete puhul eeldatakse, et kalade kokkupuute hindamiseks piisab ühest kontsentratsioonist, kuna kontsentratsioonist sõltuvus eeldatavalt puudub; asjaomase õigusraamistikuga võidakse siiski ette näha aine kasutamine kahel kontsentratsioonil. Muud liiki ainete uurimisel või juhul, kui on teada võimalikule kontsentratsioonist sõltuvusele viitavad asjaolud, tuleks katses kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni. Kui kasutatakse ainult ühte kontsentratsiooni, tuleks esitada selle kohta põhjendus (vt punkt 79). Samuti peaks katses kasutatav kontsentratsioon olema nii väike, kui on mõistlik ja tehniliselt võimalik (st mitte väga lähedal lahustuvust iseloomustavale kontsentratsioonile).

Mõnel juhul võib eeldada, et aine biokontsentreerumine sõltub aine sisaldusest vees (nt metallide puhul, mille omastamine kalades võib olla vähemalt osaliselt kontrollitud). Sellisel juhul on vaja kasutada katses vähemalt kahte, kuid soovitatavalt suuremat arvu keskkonna seisukohast asjakohaseid kontsentratsioone (vt punkt 49). Ainete puhul, mille kontsentratsioonid katses peavad praktilistel põhjustel olema lahustuvust iseloomustava kontsentratsiooni lähedal, on samuti soovitatav kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni, kuna see võib anda teavet kokkupuutekontsentratsioonide usaldusväärsuse kohta. Valitud katsekontsentratsioonid peaksid hõlmama keskkonnas reaalselt esineda võivat kontsentratsiooni ja konkreetse hindamise puhul asjakohast kontsentratsiooni.

Uuritava aine kontsentratsioon(id) tuleks valida nii, et see või need oleks(id) allpool aine kroonilise mõju avaldumise taset või alla 1 % akuutse mõju asümptootilise LC_{50} väärtusest, keskkonna seisukohast asjakohases vahemikus ja vähemalt ühe suurusjärgu võrra suurem(ad) kui kasutatava analüüsimeetodiga saavutatav aine määramispiir vees. Suurima lubatud katsekontsentratsiooni saab kindlaks teha ka nii, et aine 96 tunni jooksul avalduva akuutse mõju LC_{50} jagatakse akuutse ja kroonilise mõju suhet väljendava asjaomase suhtarvuga (näiteks on see suhtarv mõne aine puhul umbes kolm, ent mõne üksiku aine puhul üle 100). Kahe kontsentratsiooni kasutamise korral peaksid need erinema teineteisest 10 korda. Kui mürgisuse kriteerium (mis seab piirid suuremale katsekontsentratsioonile) ja analüütiline määramispiir (mis seab piirid väiksemale katsekontsentratsioonile) seda ei võimalda, võib erinevus olla väiksem ning tuleks kaaluda võimalikult puhta (soovitatavalt puhtusega > 98 %) radioaktiivselt märgistatud uuritava aine kasutamist. Tuleks jälgida, et ühegi kasutatava kontsentratsiooni puhul ei ületataks uuritava aine lahustuvust katsekeskkonnas.

Kontrollid

Peale uuritava ainega rühma(de) tuleks vastavalt vajadusele (vt punktid 30 ja 31) kasutada ühte lahjendusveega kontrolli või ühte lahustiga kontrolli.

Vee kvaliteediga seotud mõõtmiste sagedus

Katse ajal tuleks kõikides katse- ja kontrollnõudes mõõta lahustunud hapniku sisaldust, orgaanilise süsiniku üldsisaldust, pH-d ja temperatuuri. Üldkaredust ja vajaduse korral soolsust tuleks mõõta kontrollnõu(de)s ja ühes katsenõus. Kahe või enama kontsentratsiooni kasutamise korral mõõdetakse nimetatud näitajaid suuremal (või suurimal) kontsentratsioonil. Lahustunud hapnikku ja vajaduse korral soolsust tuleks mõõta omastamisperioodi jooksul vähemalt kolm korda – perioodi alguses, keskel ja lõpus – ning puhastumisperioodi jooksul vähemalt kord nädalas. Orgaanilise süsiniku üldsisaldust tuleks mõõta katse alguses (24 tundi ja 48 tundi enne omastamisetapi algust), enne kalade lisamist ning omastamis- ja puhastumisetapi vältel kord nädalas. Temperatuuri mõõtmine ja registreerimine peaks toimuma iga päev, pH mõõtmine iga perioodi alguses ja lõpus ning kareduse mõõtmine üks kord igas katses. Temperatuuri tuleks soovitatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katsenõus.

▼M7

Kala- ja veeproovide võtmine ja analüüs

Kala- ja veeproovide võtmise ajakava

Katsekambritest tuleks uuritava aine sisalduse määramiseks võtta veeproov enne kalade lisamist ning omastamis- ja puhastumisetapi kestel. Veeproov tuleks võtta enne söötmist, kalaprooviga samaaegselt. Proove võib olla kasulik võtta sagedamini, et veenduda kontsentratsiooni püsivuses pärast kalade lisamist. Omastamisetapi ajal tuleks määrata uuritava aine kontsentratsioon, et kontrollida vastavust nõuetekohasuse kriteeriumidele (punkt 24). Kui puhastumisetapi alguses võetud proovide analüüsimisel ei tuvastata uuritavat ainet, võib sellisest põhjendusest lähtuvalt jätta uuritava aine puhastumisetapi jooksul edaspidi katse- ja kontrollrühma vees määramata.

Kalaproove tuleks uuritava aine määramiseks võtta omastamisetapis vähemalt viiel korral ja puhastumisetapis vähemalt neljal korral. Kuna mõnel juhul on sellise arvu proovide põhjal keeruline arvutada BCFi hinnangulist väärtust rahuldava täpsusega, eriti kui tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikale vastava omastamise ja puhastumisega, võib olla soovitatav võtta kummagi perioodi vältel proove suurema sagedusega (vt 4. liide).

Lipiidisisaldus tuleks määrata vähemalt omastamisetapi alguses ja lõpus ning puhastumisetapi lõpus samast bioloogilisest materjalist, mida kasutatakse uuritava aine sisalduse määramiseks. Kui see ei ole teostatav, tuleks kõigil kolmel nimetatud ajahetkel võtta lipiidisisalduse määramiseks vähemalt kolmest muust kalast koosnev proov. Kalade arvu katsenõu kohta tuleks katse alguses sellele vastavalt suurendada ([1]). Teise võimalusena võib juhul, kui kontrollina kasutatavates kalades (st lähtepopulatsiooni kalades) ei tuvastata märkimisväärses koguses uuritavat ainet, määrata katse ajal kontrollrühma kalades üksnes lipiidisisalduse ja korrigeerida katserühma(de) kalades määratud uuritava aine sisaldust (ja sellest lähtuvalt omastamise kiiruskonstandi, puhastumise kiiruskonstandi ja BCFi väärtust) vastavalt katse vältel täheldatud muutustele kontrollrühma kalade lipiidisisalduses ([2]).

Surnud ja haigeid kalu ei tohiks uuritava aine sisalduse ega lipiidisisalduse suhtes analüüsida.

Vastuvõetava proovivõtukava näide on esitatud 4. liites. Teistsuguse ajakava võib hõlpsalt koostada lähtuvalt K_{OW} teistsugusest eeldatavast väärtusest, mille põhjal arvutatakse kokkupuuteperioodi pikkus, mis on vajalik aine omastamiseks 95 % ulatuses (arvutuskäik on esitatud 5. liites).

Proovivõtmist tuleks omastamisetapi vältel jätkata seni, kuni saavutatakse statsionaarne olek (mõisted ja ühikud on esitatud 1. liites) või kuni omastamisetapp loetakse muul põhjusel lõppenuks (pärast 28 või 60 päeva möödumist; vt punktid 37 ja 38). Enne puhastumisetapi algust tuleks kalad üle viia puhastesse nõudesse.

Proovivõtmine ja proovi ettevalmistamine

Analüüsitav veeproov tuleks võtta näiteks inertsest materjalist sifoontoruga katsekambri keskosast. Uuritava aine biosaadavat fraktsiooni ei pruugi alati olla võimalik filtrimise või tsentrifuugimise teel mittebiosaadavast fraktsioonist eraldada. Biosaadavusega seotud raskustest tulenevalt tuleks eraldamismeetodi kasutamise korral esitada katseprotokollis alati asjaomase meetodi kasutamise põhjendus või meetodi valideerimisandmed (25). Proovide sel viisil töötlemisest tuleks hoiduda, eriti väga hüdrofoobsete ainete puhul (st ainete puhul, mille log

([1]) Kui lipiidisisalduse ja uuritava aine sisalduse määramiseks ei kasutata sama kala, peavad asjaomased kalad olema vähemalt sarnase kehamassiga ja vajaduse korral samast soost.

([2]) Seda võimalust on lubatud kasutada üksnes juhul, kui kõik katses kasutatavad rühmad on sarnase suurusega ning kalad eemaldatakse ja neid söödetakse sama režiimi alusel. Sellega tagatakse, et kalade kasv on kõikides rühmades sarnane, kui katses kasutatav kontsentratsioon on mürgisuse avaldumise kontsentratsioonist väiksem. Sarnase kasvu korral on ka lipiidisisaldus eeldatavalt sarnane. Kasvuerinevus kontrollrühmas viitab aine mõjule ja muudab katse kehtetuks.

▼M7

K_{OW} > 5) (12, 26), mis võivad filtrile või tsentrifuuginõu seinale adsorbeeruda. Selle asemel tuleks võtta meetmed katsenõude võimalikult puhtana hoidmiseks (vt punkt 46) ja jälgida orgaanilise süsiniku üldsisaldust nii omastamis- kui ka puhastumisetapis (vt punkt 53). Biosaadavuse vähenemisest tingitud võimalike probleemide ärahoidmiseks võib raskesti lahustuvate ja väga hüdrofoobsete ainete puhul kasutada proovivõtmiseks tahke faasi abil mikroekstraheerimise meetodit.

Proovivõtmiseks valitud kalad surmatakse viivitamata kõige sobivamal ja humaansemal viisil (terve kalaga tehtavate mõõtmiste jaoks ei tohiks teha muud kui kala veega loputada (vt punkt 28) ja paberiga kuivatada). Mõõdetakse kalade mass ja üldpikkus ([1]). Iga üksiku proovivõtmiseks valitud kala puhul tuleks mõõdetud mass ja pikkus kokku viia määratud uuritava aine sisaldusega (ja vajaduse korral lipiidisisaldusega), näiteks kordumatu tunnuskoodi abil.

Kalu ja vett soovitatakse analüüsida kohe pärast proovivõtmist, et hoida ära lagunemist ja muul viisil tekkivaid kadusid ning arvutada katse jätkudes ligikaudsed omastamise ja puhastumise kiiruskonstandid. Kohese analüüsiga hoitakse ära ka viivitus platoo (statsionaarse oleku) saavutamise kindlakstegemisel.

Kui proove ei analüüsita kohe, tuleks kasutada sobivat meetodit nende säilitamiseks. Enne katse algust tuleks koguda teavet asjaomase uuritava aine jaoks sobiva säilitusmeetodi kohta – selleks võib olla näiteks sügavkülmutamine, säilitamine 4 °C juures, ekstraheerimine vms. Säilitamisaeg tuleks valida nii, et oleks välistatud aine lagunemine säilitamise ajal.

Analüüsimeetodi kvaliteet

Kuna uuritava aine määramiseks kasutatava analüüsimeetodi usaldusväärsus sõltub peamiselt meetodi mõõtetäpsusest, kordustäpsusest ja tundlikkusest, tuleb katseliselt kontrollida, kas aine analüüsi mõõtetäpsus, kordustäpsus ja reprodutseeritavus ning uuritava aine tuvastamise tõhusus vee- ja kalaproovides on asjaomase meetodi puhul rahuldavad. Seda tuleks teha eelkatsete raames. Peale selle kontrollitakse, et uuritav aine ei oleks tuvastatav lahjendusvees. Vajaduse korral korrigeeritakse katse käigus vees ja kalades mõõdetud uuritava aine kontsentratsiooni väärtusi lähtuvalt tuvastamise tõhususest ja kontrollrühmas määratud taustväärtustest. Kala- ja veeproove käsitsetakse kogu analüüsi vältel nii, et saastumine ja kaod (näiteks proovivõtuseadmele adsorbeerumise tõttu) oleksid võimalikult väikesed.

Kalaproovide analüüs

Kui katses kasutatakse radioaktiivselt märgistatud ainet, on võimalik analüüsida üldradioaktiivsust (st lähteaine ja metaboliitide summaarset radioaktiivsust) või puhastada proovi nii, et lähteainet saab analüüsida eraldi. Kui BCFi arvutamisel soovitakse aluseks võtta lähteaine, tuleks iseloomustada ka peamisi metaboliite vähemalt omastamisetapi lõpus (vt punkt 6). Peamised metaboliidid on metaboliidid, mille osakaal ainejääkide üldsisaldusest kalakudedes on ≥ 10 % või mille osakaal kahes järjestikuses proovivõtupunktis on ≥ 5 % või mille tase omastamisetapi jooksul tõuseb või mis on teadaolevalt mürgised. Kui radioaktiivselt märgistatud jääkide üldsisalduse põhjal terve kala kohta arvutatud BCF on

([1]) Peale massi tuleks registreerida ka üldpikkus, kuna katse vältel toimunud pikkuse suurenemise määrade võrdlemine annab hea ettekujutuse kahjuliku mõju esinemisest või puudumisest.

▼M7

≥ 500, võib olla kasulik peamised metaboliidid kindlaks teha ja kvantifitseerida; teatud liiki ainete, näiteks pestitsiidide puhul on see tungivalt soovitatav. Selliste metaboliitide kvantifitseerimist võivad nõuda mõned reguleerivad asutused. Kõikidest kalakudedes esinevatest radioaktiivselt märgistatud jääkidest ≥ 10 % moodustavate lagunemissaaduste tuvastamise ja kvantifitseerimise korral on soovitatav tuvastada ja kvantifitseerida need ka katsevees. Kui see ei ole teostatav, tuleks katseprotokollis esitada sellekohane selgitus.

Uuritava aine sisaldus tuleks üldjuhul määrata igas kaalutud kalas eraldi. Kui see ei ole võimalik, võib proovid igal proovivõtmisel ühte koondada, ent kuna proovide koondamine piirab andmete analüüsimiseks sobivate statistikameetodite valikut, peaks katses kasutatavate kalade arv olema piisav, et võimaldada kasutada soovitud koondproove ja statistikameetodit ning saavutada soovitud statistiline võimsus. Asjakohastest proovide koondamise meetoditest ülevaate saamiseks võib kasutada viiteid 27 ja 28.

BCFi puhul tuleks peale katses otseselt saadud väärtuse esitada ka normaliseeritud väärtus, mille aluseks on võetud kala lipiidisisaldus 5 % (märgmassist) (vt punkt 21), välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et uuritav aine akumuleerub peamiselt mujal kui rasvas. Võimaluse korral tuleks kalade lipiidisisaldus määrata igas proovivõtupunktis, soovitatavalt samas ekstraktis, mida kasutatakse uuritava aine määramiseks, sest sageli tuleb lipiidid ekstraktist eemaldada, enne kui seda saab kromatograafiliselt analüüsida. Uuritava aine määramine nõuab siiski sageli spetsiifilise ekstraheerimismeetodi kasutamist, mis ei pruugi kokku sobida lipiidide määramiseks kasutatava meetodiga. Sellisel juhul soovitatakse kuni sobiva mittepurustava instrumentaalanalüüsi meetodi kättesaadavaks muutumiseni kasutada kalade lipiidisisalduse määramiseks teistsugust strateegiat (vt punkt 56). Lipiidisisalduse määramiseks tuleks kasutada sobivat meetodit (20). Standardse meetodina võib soovitada kloroformi ja metanooliga ekstraheerimist (29, 30), teise võimalusena aga Smedesi meetodit (31). Viimati nimetatud meetodile on iseloomulik võrreldav ekstraheerimise tõhusus, suur täpsus ja vähem mürgiste orgaaniliste lahustite kasutamine ning seda on lihtne kasutada. Piisava põhjenduse esitamise korral võib kasutada ka muid meetodeid, mille täpsus on soovitatavate meetoditega võrreldes suurem. On oluline esitada kasutatud meetodi üksikasjalik kirjeldus.

Kalade kasvu mõõtmine

Katse alguses tuleb ükshaaval määrata viie kuni kümne lähtepopulatsioonist pärit kala mass ja üldpikkus. Samu kalu võib kasutada ka lipiidisisalduse määramiseks (vt punkt 56). Igal proovivõtmisel kontrollrühmast ja katserühma(de)st valitud kalad tuleks enne uuritava aine või lipiidide sisalduse määramist kaaluda ja mõõta nende pikkus. Kõnealustel valitud kaladel mõõdetud väärtusi saab kasutada katse- ja kontrollnõudesse jäänud kalade massi ja pikkuse hindamiseks (vt punkt 45).

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete töötlemine

Uuritava aine omastamise kõvera saamiseks tuleks graafikule kanda kalas või kala pinnal (või konkreetsetes kudedes) omastamisetapi käigus mõõdetud aine kontsentratsiooni sõltuvus ajast aritmeetilisel skaalal. Kui kõver on jõudnud platoole ehk muutunud ajatelje suhtes ligikaudu asümptootiliseks, tuleks statsionaarse oleku BCF (BCF_{SS}) arvutada järgmise valemiga:

$$\frac{C_f \text{statsionaarses olekus} (\text{keskmine})}{C_w \text{statsionaarses olekus} (\text{keskmine})}$$

▼M7

C_f muutumist mõjutab kalade kasv (vt punktid 72 ja 73). Keskmise kokkupuutekontsentratsiooni (C_w) väärtus sõltub kontsentratsiooni varieeruvusest. Võib eeldada, et bioakumuleerumise katsete puhul on asjakohasem ja täpsem ajaga kaalutud keskmise kontsentratsioon, seda ka juhul, kui varieeruvus jääb asjakohasesse nõutavasse vahemikku (vt punkt 24). Ajaga kaalutud keskmise kontsentratsiooni vees võib arvutada vastavalt 5. liite jaotisele 1.

Kineetiline biokontsentratsioonitegur (BCF_K) tuleks leida kahe esimest järku reaktsiooni kiiruskonstandi k_1 ja k_2 suhtarvuna. Kiiruskonstantide k_1 ja k_2 ning BCF_K arvutamiseks võib kasutada mudeli üheaegset sobitamist omastamis- ja puhastumisetapi andmetega. Teise võimalusena võib k_1 ja k_2 leida üksteise järel (nende meetodite kirjeldus ja võrdlus on esitatud 5. liites). Puhastumise kiiruskonstanti (k_2) võib olla vaja korrigeerida, et võtta arvesse kasvust tingitud lahjenemist (vt punktid 72 ja 73). Kui omastamiskõver ja/või puhastumiskõver ei vasta ilmselgelt esimest järku reaktsioonile, tuleks rakendada keerukamaid mudeleid (vt viited 5. liites) ning kasutada biostatistiku ja/või farmakokineetika spetsialisti abi.

Kalade massi- ja pikkuse andmed

Iga kala märgmass ja üldpikkus kõikides proovivõtupunktides omastamisetapi vältel (sealhulgas lähtepopulatsiooni andmed omastamisetapi alguses) ja puhastumisetapi vältel kantakse tabelisse kontrollrühma ja katserühma(de) puhul eraldi. Iga üksiku proovivõtmiseks valitud kala puhul tuleks mõõdetud mass ja pikkus kokku viia määratud uuritava aine sisaldusega, näiteks kordumatu tunnuskoodi abil. Kineetilise BCFi väärtuse korrigeerimisel kasvust tingitud lahjenemise suhtes on soovitatav kasutada kasvunäitajana massi (meetodit, mida kasutatakse andmete korrigeerimiseks kasvust tingitud lahjenemise suhtes, on kirjeldatud punktis 73 ja 5. liites).

Korrigeerimine kasvust tingitud lahjenemise suhtes ja normaliseerimine lipiidisisalduse suhtes

Kalade kasv puhastumisetapi jooksul võib vähendada kalades mõõdetud aine sisaldust, mistõttu puhastumise üldise kiiruskonstandi (k_2) väärtus võib olla suurem kui väärtus, mis tuleneb üksnes aine kõrvaldamisest (nt hingamise, metabolismi ja roojamise käigus). Kineetilist biokontsentratsioonitegurit tuleks korrigeerida kasvust tingitud lahjenemise suhtes. Kasv mõjutab ka BCF_{SS}-i väärtust, kuid BCF_{SS}-i korrigeerimiseks kasvu suhtes puudub kokkulepitud metoodika. Märkimisväärse kasvu korral tuleks leida ka kasvu suhtes korrigeeritud BCF_K (BCF_{Kg}), kuna see võib olla biokontsentratsioonitegurina asjakohasem. Katsealuste kalade lipiidisisaldus (millel on tugev seos hüdrofoobsete ainete bioakumuleerumisega) võib praktikas nii palju varieeruda, et nii kineetilise kui ka statsionaarset olekut iseloomustava biokontsentratsioonitegur mõtestatud väärtuse leidmiseks on vaja läbi viia normaliseerimine, mille aluseks on võetud teatud kindel kala lipiidisisaldus (5 massiprotsenti), välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et uuritav aine akumuleerub peamiselt mujal kui rasvas (näiteks võib mõni perfluoritud aine seonduda valkudega). Selliste arvutuste jaoks kasutatavad võrrandid ja asjakohased näited on esitatud 5. liites.

Kineetilise BCFi korrigeerimiseks kasvust tuleneva lahjenemise suhtes tuleks kasvu suhtes korrigeerida puhastumise kiiruskonstanti. Kõnealuse kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandi k_{2g} arvutamiseks lahutatakse üldisest puhastumise kiiruskonstandist k_2 kasvu kiiruskonstant k_g, mis on leitud mõõdetud kehamassi põhjal. Seejärel jagatakse omastamise kiiruskonstant k_1 kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandiga k_{2g} (vt 5. liide), et leida kasvu suhtes korrigeeritud biokontsentratsioonitegur. Mõnel juhul on sellise lähenemisviisi kasutamine raskendatud. Näiteks võib arvutatud k_{2g} ainete puhul, millest puhastumine on väga aeglane ja mida analüüsitakse kiirelt kasvavatel kaladel, olla väga väike ja selle leidmiseks kasutatud kahe kiiruskonstandiga seotud viga muutub

▼M7

väga oluliseks, ning mõnel juhul võib k_g hinnanguline väärtus olla suurem kui k_2 väärtus. Teise lähenemisviisina, mis ei nõua korrigeerimist kasvust tingitud lahjenemise suhtes, kasutatakse puhastumisandmetena mitte tavapärast uuritava aine massi kala massiühiku kohta (kontsentratsioon), vaid uuritava aine massi kala kohta (terve kala alusel). See peaks olema hõlpsalt teostatav, kuna käesoleva katsemeetodi kohaste katsete puhul peaks aine registreeritud sisaldus iga üksiku kala kudedes olema seostatav asjaomase kala massiga. Lihtsat meetodit selle lähenemisviisi kasutamiseks on tutvustatud 5. liites. Tuleb meeles pidada, et ka kõnealuse alternatiivse lähenemisviisi puhul tuleks esitada k_2 väärtus.

Samuti tuleks kineetilise ja statsionaarset olekut iseloomustava biokontsentratsiooniteguri väärtus esitada lähtuvalt standardsest kala lipiidisisaldusest 5 massiprotsenti, välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et uuritav aine akumuleerub peamiselt mujal kui rasvas. Kalas esineva kontsentratsiooni andmed ja BCF normaliseeritakse suhtarvu põhjal, mis saadakse 5 % jagamisel tegeliku keskmise (või konkreetsel kala mõõdetud) lipiidisisaldusega (protsentides märgmassist) (vt 5. liide).

Kui aine ja lipiidide sisaldus on määratud samal kalal, tuleks lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud BCFi arvutamiseks kasutada konkreetse asjaomase kala lipiidisisalduse alusel normaliseeritud andmeid. Teise võimalusena võib juhul, kui kalade kasv kontrollrühmas ja ainega kokku puutunud rühmas on sarnane, kasutada lipiidisisalduse suhtes korrigeerimiseks üksnes kontrollrühma kalade lipiidisisaldust (vt punkt 56). Lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud BCFi arvutamise meetodit on kirjeldatud 5. liites.

Tulemuste tõlgendamine

Tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, kui uuritava aine lahuses mõõdetud kontsentratsioon on analüüsimeetodi määramispiiri lähedal.

Mürgise toime välistamiseks ei tohiks keskmine kasvukiirus kontrollrühmas ja katserühma(de)s olla märkimisväärselt erinev. Kõnealuse kahe rühma kalade kasvu kiiruskonstantide või kasvukõverate võrdlemiseks tuleks kasutada sobivat meetodit ([1]).

Selgelt väljendunud omastamis- ja puhastumiskõverad viitavad kvaliteetsetele biokontsentreerumise andmetele. Kiiruskonstantide puhul peaks bioakumuleerumise mudeli sobivuse hindamiseks tehtava χ^2-testi tulemustest nähtuma hea sobivus andmetega (st protsentides väljendatav mõõtmisviga peaks olema väike (32)), et neid konstante saaks lugeda usaldusväärseks (vt 5. liide). Kui kasutatakse mitut katsekontsentratsiooni, peaks eri kontsentratsioonide vaheline omastamise/puhastumise kiiruskonstantide varieeruvus olema väiksem kui 20 % ([2]). Suurem varieeruvus võib viidata kontsentratsioonist sõltuvusele. Kui omastamise/puhastumise kiiruskonstantide puhul täheldatakse eri kontsentratsioonide vahelisi märkimisväärseid erinevusi, tuleks need registreerida ja esitada sellekohased võimalikud seletused. Üldjuhul on hästi kavandatud uuringutest saadud BCFide puhul usaldusvahemik usaldusnivool 95 % ligikaudu ± 20 % asjaomase BCFi väärtusest.

Kahe või enama kontsentratsiooni kasutamisel vaadeldakse kõikidel kontsentratsioonidel saadud tulemusi, et hinnata tulemuste omavahelist kooskõla ja teha

([1]) Kasvu kiiruskonstantide puhul võib kohaldada *t*-testi, et kontrollida, kas kasv kontroll- ja katserühma(de)s on erinev; dispersioonanalüüsi puhul võib kasutada *F*-testi. Vajaduse korral võib sobiva kasvumudeli valimise hõlbustamiseks kasutada *F*-testi või tõepärasuhte testi (OECD monograafia 54 (32)).

([2]) Selle väärtuse puhul eeldatakse, et analüüsimeetodid on usaldusväärsed ja poolväärtusaeg on < 14 päeva. Kui analüüsimeetodid ei ole nii usaldusväärsed või poolväärtusaeg on (oluliselt) pikem, on varieeruvus suurem.

▼M7

kindlaks, kas esineb kontsentratsioonist sõltuvust. Kui loomade arvu ja/või ressursikulu vähendamise eesmärgil kasutatakse ainult ühte kontsentratsiooni, tuleks esitada sellekohane põhjendus.

Kui BCF_K on oluliselt suurem kui BCF_{SS}, on BCF_{SS}-i väärtus kaheldav, kuna see võib viidata asjaolule, et statsionaarset olekut ei saavutatud või ei ole võetud arvesse kasvust tingitud lahjenemist ega kadu põhjustavaid protsesse. Kui BCF_{SS} on väga palju suurem kui BCF_K, tuleks kontrollida, kas omastamise ja puhastumise kiiruskonstantide arvutamisel on tehtud vigu, ning neid näitajaid uuesti hinnata. BCF_K hindamise tulemust võib parandada teistsuguse lähendamismeetodi kasutamine (vt 5. liide).

Katseprotokoll

Peale punktis 3 nimetatud teabe uuritava aine kohta tuleb katseprotokollis esitada järgmine teave.

Uuritav aine:

füüsikalised ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

— mitut koostisosa sisaldava aine või UVCB (tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal) puhul võimalikult täpne kirjeldus iga koostisosa keemilise määratluse kohta ja protsentuaalse osakaalu kohta aine üldmassist; tuleks anda ülevaade, kuidas katses kasutatud analüüsimeetodiga kajastatakse aine kontsentratsiooni; tuleks kirjeldada kõiki analüüsimeetodeid, sealhulgas nende täpsust, avastamispiiri ja määramispiiri;

— radioaktiivselt märgistatud ainete puhul märgistatud aatomi(te) täpne asukoht ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsentuaalne osakaal;

— teave uuritava aine mürgisuse kohta kaladel (soovitatavalt katseliigil); mürgisuse näitajatena tuleks esitada 96 tunni jooksul avalduva akuutse mõju LC_{50} ning kroonilise mõju uuringust (st varast arengujärku või kogu elutsüklit hõlmavast katsest) saadud täheldatava kahjuliku toime puudumise kontsentratsioon (NOAEC) ja vähima täheldatava kahjuliku toime avaldumise kontsentratsioon (LOAEC);

— kasutamisele eelneva säilitamise korral uuritava kemikaali või aine säilitustingimused ja püsivus sellistes säilitustingimustes.

Katseliik:

teaduslik nimetus, liin, päritolu, kõik eeltöötlused, kohandamine, vanus, sugu (vajaduse korral), suurusevahemik (mass ja pikkus) jne.

Katsetingimused:

— kasutatud katsemeetod (nt läbivoolumeetod või poolstaatiline meetod); standardne või minimeeritud katseplaan (koos põhjendusega);

— kasutatud valguse liik ja omadused ning valgustusperiood(id);

— katseplaan (näiteks katsekambrite arv ja suurus, veekoguse vahetumise kiirus, biomassisisaldus, paralleelproovide arv, kalade arv paralleelproovi kohta, katsekontsentratsioonide arv, omastamis- ja puhastumisetapi kestus, vee- ja kalaproovide võtmise sagedus);

▼M7

— põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada lahusti kirjeldus, kontsentratsioon ja osakaal katsevee orgaanilise süsiniku sisaldusest) või alternatiivse doseerimissüsteemi kirjeldus;

— nominaalsed katsekontsentratsioonid, katsenõudes saadud mõõtmistulemuste keskväärtused ja standardhälbed ning mõõtmismeetod ja -sagedus;

— lahjendusvee päritolu, kõikide eeltöötluste kirjeldus, kõik tõendid selle kohta, et kalad suudavad selles vees elada, ning vee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, kloorijääkide sisaldus (kui on mõõdetud), orgaanilise süsiniku üldsisaldus, hõljuvaine sisaldus, katsekeskkonna soolsus (vajaduse korral) ja kõikide muude mõõtmiste tulemused;

— vee kvaliteet katsenõudes, selle pH, karedus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus, temperatuur ja lahustunud hapniku sisaldus; kasutatud mõõtmismeetod ja mõõtesagedus;

— üksikasjalik teave söötmise kohta, näiteks sööda liik, päritolu, koostis (võimaluse korral vähemalt lipiidi- ja valgusisaldus), valitud söötmisrežiim, sööda kogus ja söötmissagedus;

— andmed kala- ja veeproovide töötlemise kohta, sealhulgas üksikasjad proovide ettevalmistamise ja säilitamise ning uuritava aine ja lipiidide ekstraheerimise ja nende sisalduse määramiseks kasutatud analüüsimeetodite (ja nende täpsuse) kohta;

— meetodid, mida kasutati kokkupuute suhtes randomiseerimiseks ja kalade jaotamiseks katsenõude vahel;

— katseorganismide katselahusesse viimise kuupäev ja katse kestus;

— võimaluse korral kontsentratsioonivahemiku leidmise katsete kirjeldus ja tulemused.

Tulemused:

— kõikide tehtud eeluuringute tulemused;

— kalade suremus kontrollrühmas ja igas uuritava ainega katsekambris ning kõik täheldatud ebanormaalse käitumise ilmingud;

— teave mis tahes täheldatud kahjuliku mõju kohta;

— kemikaali analüüsimise meetodite täielik kirjeldus, sealhulgas avastamis- ja määramispiir, meetodist tulenev varieeruvus ning tuvastamise tõhusus;

— kalade lipiidisisaldus ja selle määramiseks kasutatud meetod ning lipiidisisalduse suhtes normaliseerimise tegur L_n, mille abil väljendatakse tulemusi lähtuvalt kala lipiidisisaldusest 5 %;

— tabeli kujul esitatud andmed nii kontrollrühma kui ka katserühma(de) kalade massi (ja pikkuse) kohta, mis on seostatud kemikaali (ja vajaduse korral lipiidide) sisaldusega igas üksikus kalas (näiteks igale proovivõtmiseks kasutatud kalale antud kordumatu tunnuskoodi abil), ning kasvu kiiruskonstandi leidmiseks kasutatud arvutuskäik;

▼M7

— tabeli kujul esitatud andmed igal proovivõtmisel määratud aine sisalduse kohta kalades (iga üksikut kala iseloomustav C_f) ja vees (C_w) ning vajaduse korral asjaomane keskväärtus, standardhälve ja vahemik kontrollrühmas ja katserühma(de)s (C_f-i väljendatakse milligrammides terve kala või konkreetsete kudede, näiteks rasvkoe märgmassi kilogrammi kohta ja C_w-d milligrammides liitri kohta); C_w väärtus kontrollrühmas (tuleks esitada ka taustsisaldus);

— kõverad, mis hõlmavad kõiki mõõtmisandmeid ja väljendavad järgmisi näitajaid (vajaduse korral võib kontsentratsiooni väljendada terve keha massi alusel ja lipiidisisalduse suhtes normaliseerituna lähtuvalt kala või selle konkreetsete kudede lipiidisisaldusest 5 %):

  — kasv, st kalade massi muutus ajas või naturaallogaritmitud massiandmete muutus ajas (sealhulgas arvutatud kasvu kiiruskonstant k_g);

  — uuritava aine omastamine ja sellest puhastumine kalades (samal graafikul);

  — statsionaarse oleku saavutamiseks kulunud aeg (selle saavutamise korral);

  — naturaallogaritmitud kontsentratsiooniandmete muutus omastamisetapi vältel (sealhulgas arvutatud omastamise kiiruskonstant k_1);

  — naturaallogaritmitud kontsentratsiooniandmete muutus puhastumisetapi vältel (sealhulgas arvutatud puhastumise kiiruskonstant k_2) ning

  — omastamisetapi ja puhastumisetapi andmed koos lähendamiseks kasutatud mudelit iseloomustava kõveraga;

— kui graafiku visuaalsel hindamisel täheldatakse selgelt võõrväärtuste esinemist, võib kahtlaste andmepunktide väljajätmiseks kasutada statistiliselt usaldusväärset võõrväärtuste testi ja esitada dokumenteeritud põhjenduse selliste andmepunktide väljajätmise kohta;

— biokontsentratsioonitegur statsionaarses olekus (BCF_{SS}), kui see (peaaegu) saavutati;

— kineetiline biokontsentratsioonitegur (BCF_K) ning arvutatud omastamise ja puhastumise kiiruskonstandid k_1 ja k_2, järjestikuse lähendamise korral koos k_2 iseloomustava hajuvusega (tõus ja algordinaat);

— iga parameetrit igal kasutatud uuritava aine kontsentratsioonil iseloomustavad usalduspiirid ja standardhälve (vastavalt võimalusele) ning asjaomased arvutus- ja andmeanalüüsi meetodid;

  — kõik andmed radioaktiivselt märgistatud aine metaboliitide ja nende akumuleerumise kohta;

  — kasvu kiiruskonstant või -konstandid koos usaldusvahemikuga usaldusnivool 95 % ning arvutuslik kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant (k_{2g}), poolväärtusaeg ja BCF (BCF_{Kg});

  — kõik katsega seotud ebatavalised asjaolud, kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja mis tahes muu asjakohane teave;

  — allpool esitatud koondtabel asjakohaste mõõtmis- ja arvutustulemustega.

▼M7

Aine omastamise ja ainest puhastumise kiiruskonstandid ning biokontsentratsioonitegurid (BCF)	
k_g (kasvu kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV (1) nivool 95 %)
k_1 (üldine omastamise kiiruskonstant; l/kg päevas):	märkida väärtus (UV (1) nivool 95 %)
k_2 (üldine puhastumise kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV (1) nivool 95 %)
k_{2g} (kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV (1) nivool 95 %)
C_f (kemikaali kontsentratsioon kalas statsionaarses olekus; mg/kg):	märkida väärtus ± SH (2)
C_w (kemikaali kontsentratsioon vees; mg/l):	märkida väärtus ± SH (2)
L_n (lipiidisisalduse suhtes normaliseerimise tegur):	märkida väärtus (3)
BCF_{SS} (BCF statsionaarses olekus; l/kg):	märkida väärtus ± SH (2)
BCF_{SSL} (lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud BCF statsionaarses olekus; l/kg):	märkida väärtus (3) ± SH (2)
BCF_K (kineetiline BCF; l/kg):	märkida väärtus (UV (1) nivool 95 %)
BCF_{Kg} (kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline BCF; l/kg):	märkida väärtus (UV (1) nivool 95 %)
$t_{1/2g}$ (kasvu suhtes korrigeeritud poolväärtusaeg; päevades):	märkida väärtus (UV (1) nivool 95 %)
BCF_{KL} (lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud kineetiline BCF; l/kg):	märkida väärtus
BCF_{KLg} (lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud, kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline BCF; l/kg):	märkida väärtus

(1) UV – usaldusvahemik (esitatakse juhul, kui seda on võimalik hinnata).
(2) SH – standardhälve (esitatakse juhul, kui seda on võimalik hinnata).

Tuleks jälgida, et kasutatava meetodi katse-eelse väljatöötamise ja katseplaani koostamise käigus ei saadaks tulemusi, mille kohta tuleb märkida „Ei olnud avastamis-/määramispiiril avastatav/määratav“, kuna selliseid tulemusi ei saa kasutada kiiruskonstantide arvutamiseks.

C.13 – II: **KALADE VEEKAUDSE KOKKUPUUTE KATSE MINIMEERITUD KUJUL**

SISSEJUHATUS

Täismahus katse läbiviimisel ja katsetulemuste tõlgendamisel laborites ja reguleerivates asutustes saadud üha suurematest kogemustest ilmneb, et omastamise ja puhastumise kiiruskonstandi hindamisel saab kohaldada esimest järku reaktsiooni kineetikat, välja arvatud mõnel erandjuhul. Seega on omastamise ja puhastumise kiiruskonstanti ning kineetilist BCFi võimalik leida minimaalse arvu proovivõtupunktide põhjal.

Biokontsentreerumise uuringute jaoks alternatiivse katseplaani väljatöötamise algeesmärk oli võimaldada viia vaheastmena läbi väikesemahuline katse, millega

▼M7

saaks K_{OW}-l ja QSAR-meetoditel põhinevaid hinnangulisi BCFi väärtusi kinnitada või need ümber lükata ja mille teostamisega langeks paljude ainete puhul ära vajadus teha täismahus katse; samuti sooviti proovivõtmiste ja analüüsietappide arvu vähendamisega minimeerida kulusid ja kasutatavate loomade arvu. Seejuures järgiti varasema katsemeetodi ülesehituse põhiaspekte, et võimaldada katsetulemuste ühildamist olemasolevate BCFi andmetega ning hõlbustada katsete tegemist ja andmete tõlgendamist; eesmärgiks võeti saavutada selline hinnanguline BCFi väärtus, mille puhul mõõtetäpsus ja kordustäpsus on riskihinnanguga seotud otsuste tegemiseks piisav. Minimeeritud katseplaani puhul kehtivad suures osas samad kaalutlused kui täismahus katse puhul, näiteks nõuetekohasuse kriteeriumid (vt punkt 24) ja võimalus katse lõpetada, kui omastamisetapi lõpus ei täheldata märkimisväärset aine omastamist (vt punktid 16 ja 38).

Ained, mida võib uurida minimeeritud katseplaani alusel, peaksid kuuluma sellesse üldkategooriasse, mille jaoks kõnealune katseplaan välja töötati, st mittepolaarsete orgaaniliste ainete klassi (vt punkt 49). Kui on tähelepanekuid selle kohta, et uuritav aine võib käituda teisiti (näiteks ei ole selgelt tegemist esimest järku reaktsiooni kineetikaga), tuleks regulatiivsetel põhjustel teha täismahus katse.

Tavaliselt ei ole minimeeritud kujul tehtav katse lühem kui standardne BCFi määramise katse, kuid hõlmab väiksemat arvu kalaproove (seda on selgitatud 6. liites). Ainete puhul, millest puhastumine on kiire, võib puhastumisetapi kestust siiski lühendada, et hoida ära kalas sisalduva aine kontsentratsiooni langemist allapoole avastamis-/määramispiiri enne katse lõppu. Täismahus katse läbiviimise vajaduse kindlakstegemiseks võib kaladega teha minimeeritud kujul kokkupuutekatse ühel kontsentratsioonil ning kui saadud andmed, mille põhjal arvutatakse kiiruskonstandid ja BCF, on usaldusväärsed (vt punkt 93), võib täismahus katse jätta tegemata juhul, kui leitud BCF erineb märkimisväärselt õiguslikult reguleeritavatest väärtustest.

Mõnel juhul võib eelkatsena olla kasulik teha minimeeritud plaani kohane katse mitmel kontsentratsioonil, et teha kindlaks, kas aine hinnanguline BCF on sõltuv kontsentratsioonist. Kui minimeeritud kujul tehtud katsest saadud hinnangulise BCFi puhul täheldatakse kontsentratsioonist sõltuvust, tuleb viia läbi täismahus katse. Kui sellisest minimeeritud kujul katsest leitud hinnanguline BCF ei ole kontsentratsioonist sõltuv, kuid tulemusi ei saa pidada lõplikeks, võib järgnevas täismahus katses kasutada kahe (või enama) kontsentratsiooni asemel ühte kontsentratsiooni, et vähendada katsealuste loomade arvu.

Aine, mis võib sobida minimeeritud kujul katse tegemiseks, peaks vastama järgmistele kriteeriumidele:

— selle omastamise ja sellest puhastumise kineetika peaks näiteks sarnaste ainetega saadud tulemustest lähtuvalt suure tõenäosusega ligikaudselt vastama esimest järku reaktsiooni kineetikale;

— selle log K_{OW} peaks olema alla 6, välja arvatud juhul, kui eeldatakse kiiret metaboliseerumist ([1]);

— selle lahustuvus vees peaks olema asjaomast analüüsimeetodit silmas pidades piisav (vt punkt 24);

— see peaks olema nii kalades kui ka vees hästi mõõdetav (st selle kontsentratsioon peaks olema vähemalt ühe suurusjärgu võrra suurem kui meetodi määramispiir) – soovitatakse kasutada radioaktiivset märgistamist (vt punkt 23) – ning

— selle puhul eeldatav puhastumisetapi kestus peaks olema pikem kui aine eeldatav poolväärtusaeg (arvutuskäik on esitatud 5. liites); vastasel juhul tuleks puhastumisetapi kestust vastavalt muuta (vt punkt 91). Sellest reeglist võib teha erandi, kui aine on eeldatavalt kiirelt metaboliseeruv.

([1]) Minimeeritud katseplaani võibki kasutada kiire metaboliseerumise tõendamiseks, kui on teada, et kiire metaboliseerumine on tõenäoline.

▼M7

PROOVIVÕTU AJAKAVA MINIMEERITUD KATSEPLAANI ALUSEL TEHTAVAS KATSES

Kalaproovide võtmine

Kalaproove võetakse vaid neljas proovivõtupunktis:

— omastamisetapi keskel ja lõpus (viimane tähistab ühtlasi puhastumisetapi algust), näiteks 14 ja 28 päeva möödudes (33);

— puhastumisetapi keskel ja katse lõpus (mil aine sisaldus on < 10 % maksimumsisaldusest või vähemalt selgelt väiksem kui aine poolväärtusajale vastav sisaldus), näiteks 7 ja 14 päeva pärast puhastumisetapi algust (33). Kui eeldatakse või täheldatakse kiiret puhastumist, võib olla vaja lühendada puhastumisetapi kestust, et aine sisaldus kalas ei langeks määramispiirist allapoole.

— Lipiidisisaldust mõõdetakse samal viisil kui täismahus katses.

— Kasvu suhtes korrigeerimine toimub samal viisil kui täismahus katses.

— BCF arvutatakse kineetilise BCFina.

Veeproovide võtmine

Minimeeritud katseplaani puhul võetakse veeproove sama sagedusega kui täismahus katses (vt punkt 54) või omastamisetapis vähemalt viis korda võrdsete ajavahemike järel ja puhastumisetapis kord nädalas.

Katseplaani muudatused

Lähtuvalt uuritava aine omadustest, usaldusväärsest QSAR-meetodil põhinevast hinnangust ja uuringu konkreetsest eesmärgist võib kaaluda katseplaanis järgmiste muudatuste tegemist.

— Kui on vaja saavutada suuremat täpsust, võib suurendada kalade arvu omastamisetapi lõpus võetavas proovis (4 asemel 6 või 8).

— Kui puhastumine ei ole 14 päeva jooksul (või puhastumisetapi eeldatava lõppemise ajaks) olnud piisav (st > 50 %), võib kasutada ühte täiendavat kalade rühma. Kui puhastumisetapi eeldatav kestus on lühem või pikem kui 14 päeva, tuleks proovivõtu ajakava vastavalt kohandada (st valida üks rühm kalu puhastumisetapi eeldatava lõppemise ajal ja üks rühm ajal, mil on möödunud pool etapi kestusest).

— Võimaliku kontsentratsioonist sõltuvuse kindlakstegemiseks võib kasutada kahte katsekontsentratsiooni. Kui minimeeritud plaani kohase kahel kontsentratsioonil tehtud katse tulemustest nähtub, et BCF ei ole kontsentratsioonist sõltuv (st erinevus on väiksem kui 20 %), võib täismahus katse tegemise korral lugeda ühe katsekontsentratsiooni kasutamise piisavaks.

— Näib, et bioakumuleerumise protsesse kirjeldavaid mudeleid, näiteks neid, mille on välja pakkunud Arnot *et al.* (35), on võimalik kasutada omastamis- ja puhastumisetapi kestuse hõlpsamaks kavandamiseks (vt ka 5. liide).

Arvutused

Siin kirjeldatud lähenemisviisi puhul lähtutakse põhimõttest, et biokontsentratsiooniteguri võib täismahus katse tulemuste põhjal leida kas biokontsentratsioonitegurina statsionaarses olekus (BCF_{SS}), mis väljendab kalakudedes esineva uuritava aine kontsentratsiooni ja vees esineva uuritava aine kontsentratsiooni suhet, või kineetilise biokontsentratsioonitegurina (BCF_K), mis väljendab omastamise kiiruskonstandi k_1 ja puhastumise kiiruskonstandi k_2 suhet. BCF_K on kehtiv ka olukorras, kus omastamisetapis ei saavutata aine sisalduse puhul statsionaarset olekut, eeldusel, et omastamine ja puhastumine toimuvad ligikaudu

▼M7

vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Omastamise ja puhastumise kiiruskonstandi hindamiseks on vaja minimaalselt kahte andmepunkti, üks neist omastamisetapi lõpus (st puhastumisetapi alguses) ja teine puhastumisetapi lõpus (või punktis, kus oluline osa puhastumisetapist on möödas). Omastamise ja puhastumise kineetika kontrollimiseks on soovitatav lisada vahepealne proovivõtupunkt ([1]). Arvutuskäik on esitatud 5. ja 6. liites.

Tulemuste tõlgendamine

Katse nõuetekohasuse ja tulemuste teabeväärtuse tagamiseks veendutakse, et puhastumisperioodi kestus on pikem kui üks poolväärtusaeg. Samuti tuleks BCF_{Km}-i (minimeeritud kujul katsest saadud kineetiline BCF) võrrelda minimeeritud katseplaani kohase BCF_{SS}-i väärtusega, mis on arvutatud omastamisetapi lõpus lähtuvalt eeldusest, et on saavutatud statsionaarne olek. Viimast on võimalik üksnes eeldada, sest proovivõtupunktide arv ei ole selle tõendamiseks piisav. Kui BCF_{Km} on väiksem kui minimeeritud kujul katse kohane BCF_{SS}, tuleks eelistada viimast. Kui BCF_{Km} on alla 70 % minimeeritud kujul katse kohasest BCF_{SS}-st, ei ole tulemused kehtivad ja tuleks läbi viia täismahus katse.

Kui minimeeritud kujul katsest saadud BCF_{Km}-i väärtus jääb õiguslikult reguleeritavasse vahemikku, tuleks teha täismahus katse. Kui saadud väärtus erineb märkimisväärselt kõikidest õiguslikult reguleeritavatest väärtustest (on neist oluliselt suurem või väiksem), ei pruugi täismahus katse tegemine olla vajalik või võib selle teha ühel kontsentratsioonil, kui asjaomases õigusraamistikus seda nõutakse.

Kui pärast minimeeritud kujul ühel kontsentratsioonil tehtud katset leitakse olevat vajalik viia läbi täismahus katse, võib selle teha ühel muul kontsentratsioonil. Kui tulemused on omavahel kooskõlas, võib täiendava täismahus katse veel ühel kontsentratsioonil ära jätta, kuna aine biokontsentreerumine ei ole eeldatavalt kontsentratsioonist sõltuv. Kui minimeeritud kujul katse on tehtud kahel kontsentratsioonil ja tulemustest ei nähtu kontsentratsioonist sõltuvust, võib täismahus katse teha ainult ühel kontsentratsioonil (vt punkt 87).

Katseprotokoll

Minimeeritud kujul tehtud katse protokoll peaks sisaldama kõiki täismahus katse puhul nõutavaid andmeid (vt punkt 81), välja arvatud andmed, mida ei ole võimalik esitada (st kõver, mis väljendab aega statsionaarse oleku saavutamiseni, ning biokontsentratsioonitegur statsionaarses olekus; viimase asemel tuleks esitada minimeeritud kujul katse kohane BCF_{ss}). Peale selle tuleks katseprotokollis esitada minimeeritud katsemeetodi kasutamise põhjendus ja leitud BCF_{Km}.

C.13 – III: **TOIDUKAUDSEL KOKKUPUUTEL BIOKONTSENTREERUMISE KATSE KALADEGA**

SISSEJUHATUS

Käesolevas osas kirjeldatud meetodit tuleks kasutada ainete puhul, mille uurimine veekaudse kokkupuute meetodiga ei ole teostatav (näiteks seetõttu, et aine sisaldust vees ei suudeta hoida püsiva ja mõõdetavana või et 60 päeva pikkuse kokkupuuteperioodi jooksul ei ole võimalik saavutada aine piisaval määral kontsentreerumist organismis; veekaudse kokkupuute meetodit on kirjeldatud eespool olevates osades). Tuleks siiski silmas pidada, et käesoleva meetodi puhul leitav lõppnäitaja on biokontsentratsiooniteguri (BCF) asemel toidukaudse biokuhjumise tegur (BMF) ([2]).

2001. aasta mais Madridis toimunud Keskkonnatoksikoloogia ja -keemia Ühingu (SETAC) Euroopa üksuse konverentsil tutvustati uut meetodit vees raskesti lahustuvate orgaaniliste ainete bioakumuleerumise hindamiseks (36). Selle meetodi väljatöötamisel lähtuti mitmest varem avaldatud bioakumuleerumise uuringust, kus kasutati söödasse uuritava aine lisamisel põhinevat doseerimismeetodit (nt viide 37). 2004. aasta alguses esitati püsivate, bioakumuleeruvate ja mürgiste kemikaalide ELi töörühmale sellise meetodi kavand (38), mis oli ette

([1]) Kui mõõtmisi tehakse ainult kahes andmepunktis, võib BCF_{Km}-i usalduspiiride hindamiseks kasutada andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimise meetodit (*bootstrapping*). Kui kasutatakse ka vahepealseid andmepunkte, võib BCF_{Km}-i usalduspiirid arvutada samal viisil kui täismahus katses.

([2]) Mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites.

▼M7

nähtud võimaliku bioakumuleerumise tuvastamiseks selliste vees raskesti lahustuvate orgaaniliste ainete puhul, mida ei saa uurida veekaudsel kokkupuutel toimuva biokontsentreerumise hindamise standardmeetodiga; nimetatud kavandiga koos esitati ka seda toetav taustdokument (39). Kõnealuse meetodi vajalikkust põhjendati ka sellega, et võimalik kokkupuude selliste raskesti lahustuvate ainetega (st ained, mille log K_{OW} > 5) võib keskkonnas toimuda suures osas toidu kaudu (vt viited 40–44). Sel põhjusel on mõnes kemikaale käsitlevas avaldatud määruses viidatud toidukaudse kokkupuute katsetele [1]. Tuleks siiski meeles pidada, et siin kirjeldatud meetodi puhul hoidutakse hoolikalt veefaasi kaudu kokkupuute loomisest, mistõttu sel viisil leitud BMFi väärtus ei ole otseselt võrreldav väliuuringust saadud BMFi väärtusega (mille puhul kokkupuude võib üheaegselt toimuda nii vee kui ka toidu kaudu).

Käesoleva katsemeetodi käesolev osa põhineb eespool nimetatud meetodil (38) ning selles kirjeldatakse uut meetodit, mis puudus katsemeetodi C.13 eelmises versioonis. Kõnealune alternatiivne meetod võimaldab uurida otsest toidukaudset kokkupuudet kontrollitud laboritingimustes.

Selliste uuringute võimalikel läbiviijatel tuleks tutvuda kõnealuse katsemeetodi punktidega 1–14, mis sisaldavad teavet selle koha, millal võib olla parem kasutada veekaudse kokkupuute katse asemel toidukaudse kokkupuute katset. Seal on esitatud uuritavate ainetega seotud eri kaalutlused, mida tuleks enne katse tegemist arvesse võtta.

Radioaktiivselt märgistatud uuritavate ainete kasutamist tuleks kaaluda sarnasel viisil kui veekaudse kokkupuute meetodi puhul (vt punktid 6 ja 65).

Toidukaudse kokkupuute meetodit võib kasutada rohkem kui ühe aine hindamiseks samas katses, kui on täidetud teatavad kriteeriumid, mida on põhjalikumalt käsitletud punktis 112. Lihtsuse huvides on siin kirjeldatud ainult ühe uuritava ainega tehtava katse metoodikat.

Toidukaudse ja veekaudse kokkupuute meetodid on paljuski sarnased, välja arvatud muidugi kokkupuuteviisi poolest. Seega kattuvad paljud siin kirjeldatud meetodi üksikasjad eelmistes osades kirjeldatud veekaudse kokkupuute meetodi omadega. On esitatud võimalikult palju viiteid eelmiste osade asjakohastele punktidele, ent loetavuse ja arusaadavuse huvides on teataval määral kordamine paratamatu.

KATSE PÕHIMÕTE

Võib kasutada läbivoolurežiimi või poolstaatilist režiimi (vt punkt 4); soovitatavalt tuleks kasutada läbivoolurežiimi, et piirata võimalikku veekaudset kokkupuudet uuritava ainega tulenevalt selle desorbeerumisest rikastatud söödast või väljaheidetest. Katse hõlmab kahte etappi: omastamine (uuritava ainega rikastatud sööt) ja puhastumine (puhas töötlemata sööt) (vt punkt 16). Omastamisetapis söödetakse katserühma(de) kalu iga päev kindlaksmääratud kaubandusliku kalasöödaga, mille koostis on teada ja millesse on lisatud uuritavat ainet. Ideaaljuhul peaksid kalad ära tarbima kogu pakutava sööda (vt punkt 141). Seejärel söödetakse kalu puhastumisetapi vältel puhta töötlemata kaubandusliku kalasöödaga. Nagu veekaudse kokkupuute meetodi puhul, võib ka siin kasutada vajaduse

[1] Seda küsimust on seoses määrusega (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) (ELT L 396, 30.12.2006, lk 1), käsitletud dokumendi „Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment“ („Teabenõudeid ja kemikaalide ohutuse hindamist käsitlevad suunised“) peatüki R.7c punktis R.7.10.3.1, punktis R.7.10.4.1 ja joonisel R7.10–2.

▼M7

korral rohkem kui ühte katserühma, kellele antav sööt sisaldab rikastamiseks kasutatavat uuritavat ainet eri kontsentratsioonides, kuid enamiku väga hüdrofoobsete orgaaniliste ainete puhul piisab ühest katserühmast (vt punktid 49 ja 107). Poolstaatilise režiimi kasutamise korral tuleks kalad viia omastamisetapi lõpus üle uude katsekeskkonda ja/või katsekambrisse (kui omastamisetapi ajal kasutatud katsekeskkond ja/või seadmed on leostumise tagajärjel uuritava ainega saastunud). Uuritava aine kontsentratsiooni kalas mõõdetakse katse kummagi etapi kestel. Peale rikastatud sööta saavate kalade rühma (katserühm) kasutatakse kontrollrühma, mille kalu hoitakse identsetes tingimustes ja söödetakse täpselt samal viisil kaubandusliku kalasöödaga, mis ainsa erinevusena ei ole rikastatud uuritava ainega. Kõnealune kontrollrühm võimaldab kvantitatiivselt määrata uuritava aine taustsisalduse ainega mitte kokku puutunud kalades ja kasutada seda võrdlusalusena ainega kokkupuutumisest tuleneva mis tahes kahjuliku toime hindamisel katserühma(de)s ([1]). Ühtlasi võimaldab see võrrelda kasvu kiiruskonstante eri rühmades ja seeläbi veenduda, et pakutud sööta on tarbitud sarnases koguses (kasvu kiiruskonstandi väärtuste erinevuse põhjendamisel tuleks kaaluda ka söötade võimalikke maitseerinevusi; vt punkt 138). Nii omastamis- kui ka puhastumisetapis on oluline anda katserühma(de) ja kontrollrühma kaladele sama toiteväärtusega sööta.

Meetodi väljatöötajate kogemuste põhjal piisab üldjuhul 7–14 päeva pikkusest omastamisetapist (38, 39). See vahemik peaks võimaldama minimeerida katse läbiviimise kulusid ja tagada samas enamiku ainete puhul piisava kokkupuutemäära. Mõnel juhul võib omastamisetapi kestust siiski pikendada (vt punkt 127). Aine sisaldus kalas ei pruugi omastamisetapi jooksul saavutada statsionaarsele olekule vastavat väärtust, mistõttu käesoleva meetodi puhul põhinevad andmetöötlus ja tulemused üldjuhul kudedes leiduvate jääkide kineetilisel analüüsil. (Märkus: statsionaarse oleku saavutamiseks kuluva aja hindamise võrrandeid võib siin kasutada samamoodi kui veekaudse kokkupuute katse puhul – vt 5. liide.) Puhastumisetapp algab hetkel, mil kaladele antakse esmakordselt rikastamata sööta, ning kestab tavaliselt kuni 28 päeva või seni, kuni uuritav aine ei ole terves kalas enam tuvastatav, kui selline hetk saabub varem. Puhastumisetappi võib sõltuvalt kemikaali mõõdetud sisalduse muutumisest ajas ja olenevalt kalade suurusest lühendada või muuta selle 28 päevast pikemaks.

Käesolev meetod võimaldab määrata kalas esineva konkreetse uuritava aine poolväärtusaja ($t_{1/2}$, puhastumise kiiruskonstandi k_2 alusel), imendumistõhususe (absorbeerumine soolestikus; a), kineetilise toidukaudse biokuhjumise teguri (BMF_K), kasvu suhtes korrigeeritud kineetilise toidukaudse biokuhjumise teguri (BMF_{Kg}) ja lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud ([2]) kineetilise toidukaudse biokuhjumise teguri (BMF_{KL}) (ja/või nii kasvu kui ka lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud kineetilise toidukaudse biokuhjumise teguri BMF_{KgL}). Nagu ka veekaudse kokkupuute meetodi puhul, nii põhjustab kalade kehamassi suurenemine katse vältel siingi uuritava aine lahjenemise kasvavates kalades, mistõttu (kineetilise) BMFi väärtust alahinnatakse juhul, kui seda ei korrigeerita kasvu suhtes (vt punktid 162 ja 163). Peale selle saab juhul, kui omastamisetapis saavutati eelduste kohaselt statsionaarne olek, arvutada statsionaarsele olekule vastava BMFi hinnangulise väärtuse. On välja töötatud lähenemisviisid, mis võimaldavad hinnata kineetilise biokontsentratsiooniteguri (BCF_K) väärtust lähtuvalt toidukaudse kokkupuute uuringu andmetest (nt viited 44–48). Selliste lähenemisviiside positiivseid ja negatiivseid külgi on käsitletud 8. liites.

([1]) Enamiku uuritavate ainete puhul ei tohiks aine ideaaljuhul olla kontrollrühma vees tuvastatav. Taustsisaldus peaks olema asjakohane üksnes looduslikult esinevate materjalide (nt mõned metallid) ja keskkonnas laialdaselt levinud ainete puhul.

([2]) Kuna BMF on määratletud kui suhtarv, mis väljendab organismis esineva aine kontsentratsiooni ja organismi toidus esineva aine kontsentratsiooni suhet statsionaarses olekus, korrigeeritakse seda lipiidisisalduse arvessevõtmiseks nii organismi kui ka toidu lipiidisisalduse suhtes ning seega on täpsem nimetada seda korrigeerimiseks. See lähenemisviis erineb veekaudsel kokkupuutel toimuva biokontsentreerumise katses tehtavast normaliseerimisest organismi teatud kindla lipiidisisalduse alusel.

▼M7

Käesolev meetod töötati välja peamiselt raskesti lahustuvate mittepolaarsete orgaaniliste ainete jaoks, mille omastamine ja millest puhastumine toimub kalades ligikaudu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Kui katses kasutatakse ainet, mille omastamine ja millest puhastumine ei toimu ligikaudu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale, tuleks rakendada keerukamaid mudeleid (vt viited 5. liites) ning kasutada biostatistiku ja/või farmakokineetika spetsialisti abi.

BMFi määramiseks analüüsitakse uuritavat ainet üldjuhul terves kalas (lähtuvalt märgmassist). Kui see on uuringu eesmärkide saavutamiseks asjakohane, võib proovi võtta konkreetsest koest (nt lihaskude, maks), kui kala on jagatud söödavaks ja mittesöödavaks osaks (vt punkt 21). Peale selle võib eemaldada seedekulgla ja seda eraldi analüüsida kas massibilansil põhineva lähenemisviisi raames või selleks, et teha kindlaks selles leiduva ainekoguse osakaal terves kalas leiduvas ainekoguses omastamisetapi lõpus ja veidi pärast puhastumisetapi algust võetud proovides.

Tuleks mõõta proovivõtmiseks valitud tervete kalade lipiidisisaldus, et aine kontsentratsiooni saaks korrigeerida nii kalade kui ka sööda lipiidisisalduse suhtes (vt punktid 56 ja 57 ning 7. liide).

Katse jooksul toimuda võiva kasvu kindlakstegemiseks tuleks iga proovivõtmiseks valitud kala kaaluda ning massiandmed registreerida ja seostada konkreetses kalas mõõdetud kemikaali kontsentratsiooniga (näiteks sel viisil, et registreerimisel kasutatakse igale analüüsitud kalale antud kordumatut tunnuskoodi). Samuti tuleks võimaluse korral mõõta kala üldpikkus ([1]). Massiandmed on vajalikud ka BCFi hinnangulise väärtuse leidmiseks toidukaudse kokkupuute katsest saadud puhastumisandmete põhjal.

TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Uuritava aine kohta peaks olema kättesaadav punktides 3 ja 22 kirjeldatud teave. Andmed analüüsimeetodi kohta, mis võimaldab määrata uuritava aine sisaldust vees, ei ole üldjuhul vajalikud, ent tuleb esitada teave meetodite kohta, mis võimaldavad sobiva tundlikkusega mõõta aine sisaldust kalasöödas ja kalakudedes.

Käesolevat meetodit võib kasutada rohkem kui ühe aine hindamiseks samas katses. Sel juhul peavad uuritavad ained sobima koos kasutamiseks: need ei tohi kalasöödale lisatuna üksteist vastastikku mõjutada ega oma keemilisi omadusi muuta. Eesmärk on tagada, et iga uuritava aine puhul saadud mõõtmistulemused ei erineks ainete koos kasutamisel oluliselt tulemustest, mis saadaks iga ainega eraldi katse tegemise korral. Eelanalüüsi käigus tuleks veenduda, et iga asjaomane aine on mitme ainega rikastatud söödast ja kala koeproovist tuvastatav i) suure tõhususega (nt > 85 % ulatuses nominaalsest sisaldusest) ja ii) katse läbiviimiseks vajaliku tundlikkusega. Koos analüüsitavate ainete summaarne sisaldus peaks olema väiksem kui võimaliku mürgise toime avaldumise summaarne kontsentratsioon (vt punkt 51). Peale selle tuleks katseplaani koostamisel arvesse võtta mitme aine üheaegsest katses kasutamisest tuleneda võivat kahjulikku mõju kaladele ja ainete võimalikku vastastikust toimet (nt metaboolne toime). Ioniseeruvate ainete koos kasutamisest tuleks hoiduda. Käesolev meetod sobib ka keerukate segudega kokkupuute hindamiseks (vt punkt 13; sellise analüüsi puhul kehtivad siiski samad piirangud kui kõikide muude meetodite puhul).

KATSE NÕUETEKOHASUS

Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised tingimused (vt punkt 24):

— veetemperatuuri varieeruvus katserühma(de)s ja kontrollrühmas on väiksem kui ± 2 °C;

([1]) Katse käigus tuleks registreerida ka üldpikkus, kuna selle näitaja alusel saab hästi hinnata, kas aine on avaldanud kahjulikku toimet.

▼M7

— lahustunud hapniku sisaldus ei lange alla 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist;

— uuritava aine sisaldus kalasöödas enne omastamisetapi algust ja selle lõpus ei erine rohkem kui ± 20 % (kummalgi ajahetkel võetud vähemalt kolme proovi andmete alusel);

— rikastatud söödaga tehtava eelanalüüsi käigus tuleks tõendada, et aine sisaldus söödas on väga homogeenne; see ei tohiks katse alguses võetud vähemalt kolmes proovis erineda keskväärtusest rohkem kui ± 15 %;

— uuritav aine peaks rikastamata söödas ja kontrollkalade kudedes olema tuvastamatu või esinema uuritava ainega proovidega võrreldes vaid tüüpilises mikrokoguses;

— suremus või kahjuliku mõju või haiguse osakaal kontroll- ja katserühma kalade hulgas peaks katse lõpus olema ≤ 10 %; kui katset mingil põhjusel pikendatakse, peab kahjuliku mõju osakaal kummaski rühmas olema ≤ 5 % kuus ja kokku ≤ 30 %. Oluline erinevus katserühma(de)st ja kontrollrühmast analüüsimiseks võetud kalade kasvukiiruses võib viidata uuritava aine mürgisele toimele.

VÕRDLUSAINED

Kui laboris ei ole asjaomast katset varem läbi viidud või seal on tehtud olulisi muudatusi (nt on muutunud kalaliik, kalade liin või tarnija, toimunud olulisi muudatusi seoses kalade suuruse, kalasööda või rikastamismeetodiga vms), on soovitatav teha tehnilise pädevuse katse võrdlusainega. Võrdlusainet kasutatakse eelkõige selle kindlakstegemiseks, kas sööda rikastamise meetod sobib uuritava aine maksimaalse homogeensuse ja biosaadavuse tagamiseks. Ühe näitena võib tuua mittepolaarsete hüdrofoobsete ainete puhul võrdlusainena kasutatud heksaklorobenseeni, kuid selle aine ohtlike omaduste tõttu ([1]) tuleks kaaluda mõne muu aine kasutamist, mille kohta on olemas usaldusväärsed omastamist ja biokuhjumist käsitlevad andmed. Võrdlusaine kasutamise korral tuleks katseprotokollis esitada asjaomase aine kohta sama põhiteave kui uuritavate ainete kohta, sealhulgas aine nimetus, puhtus, CASi number, struktuur ja võimaluse korral mürgisust käsitlevad andmed (vt punktid 3 ja 22).

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

Tuleks kasutada veekaudse kokkupuute meetodis kirjeldatud materjale ja seadmeid (vt punkt 26). Tuleks kasutada läbivoolusüsteemi või staatilist uuendamisega süsteemi, millega tagatakse lahjendusvee piisava koguse lisamine katsenõudesse. Voolukiirus tuleks registreerida.

Vesi

Katses tuleks kasutada sellist vett, nagu on kirjeldatud veekaudse kokkupuute meetodis (vt punktid 27–29). Katsekeskkond peaks olema kirjeldatud viisil iseloomustatud ja selle kvaliteet peaks olema katse vältel püsiv. Selle looduslik tahkete osakeste sisaldus ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus peaks enne katse algust olema võimalikult väike (tahkeid osakesi ≤ 5 mg/l; orgaanilise süsiniku üldsisaldus ≤ 2 mg/l). Orgaanilise süsiniku üldsisaldust on vaja mõõta üksnes katsevee iseloomustamise käigus enne katse algust (vt punkt 53).

([1]) Heksaklorobenseen on loetletud Stockholmi konventsiooni A ja C lisas ning püsivaid orgaanilisi saasteaineid käsitleva määruse (EÜ) nr 850/2004 (ELT L 158, 30.4.2004, lk 7) I ja III lisas.

▼M7

Toit

Soovitatakse kasutada müügilolevat kalasööta (ujuvsööt ja/või aeglaselt põhja vajuv granuleeritud sööt), mille puhul on teada vähemalt selle valgu- ja rasvasisaldus. Söödagraanulid peaksid olema ühesuurused, et kokkupuude söödaga oleks tõhusam, st et kalad sööksid rohkem graanuleid, selle asemel et süüa suuremaid tükke ja jätta väikesed tükid alles. Graanulite mõõtmed peaksid vastama kalade suurusele katse alguses (näiteks võib kalade jaoks, kelle üldpikkus on 3–7 cm, kasutada graanuleid läbimõõduga umbes 0,6–0,85 mm ning kalade jaoks, kelle üldpikkus on 6–12 cm, graanuleid läbimõõduga 0,85–1,2 mm). Graanulite suurust võib sõltuvalt kalade kasvust puhastumisetapi alguses muuta. Müügiloleva sööda sobiva koostise näide on esitatud 7. liites. Käesoleva meetodi väljatöötamisel on tavapäraselt kasutatud katsesööta, milles lipiidide üldsisaldus on 15–20 massiprotsenti. Mõnes piirkonnas ei pruugi nii suure lipiidisisaldusega kalasööt olla kättesaadav. Sellisel juhul võib uuringus kasutada väiksema lipiidisisaldusega sööta ja kohandada vajaduse korral söötmisrežiimi, et tagada kalade püsimine tervena (lähtuvalt eelkatsete tulemustest). Lipiidide üldsisaldus tuleb katserühma(de) ja kontrollrühma söödas mõõta ja registreerida enne katse algust ja omastamisetapi lõpus. Katseprotokollis tuleks esitada sööda kaubanduslikult tarnijalt pärit analüüsiandmed toitaine-, niiskuse-, kiudaine- ja tuhasisalduse ning võimaluse korral mineraalainete ja pestitsiidijääkide (nt „standardsete“ prioriteetsete saasteainete) sisalduse kohta.

Sööda rikastamisel uuritava ainega tuleks teha kõik, et tagada aine homogeensus katsesöödas. Uuritava aine kontsentratsioon katserühma(de) söödas tuleks valida lähtuvalt analüüsimeetodi tundlikkusest, uuritava aine mürgisusest (täheldatava toime puudumise kontsentratsioonist, kui see on teada) ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest näitajatest. Võrdlusaine kasutamise korral peaks selle kontsentratsioon olema soovitatavalt umbes 10 % uuritava aine kontsentratsioonist (või igatahes võimalikult väike); seejuures tuleks arvesse võtta analüüsimeetodi tundlikkust (nt heksaklorobenseeni puhul on vastuvõetav sisaldus söödas leitud olevat 1–100 μg/g; lisateave heksaklorobenseeni imendumise tõhususe kohta on esitatud viites 47).

Kalasööta võib uuritava ainega rikastada aine füüsikalistest omadustest ja lahustuvusest sõltuvalt mitmel eri viisil (rikastamismeetodeid on üksikasjalikumalt kirjeldatud 7. liites):

— kui aine on triglütseriidides lahustuv ja püsiv, tuleks see enne kalasöödaga segamist lahustada väikeses koguses kalaõlis või taimses toiduõlis. Sel juhul tuleks jälgida, et valmistatav sööt ei sisaldaks rikastamiseks kasutatava sööda tavapärase lipiidisisaldusega võrreldes liiga palju lipiide; seepärast lisatakse söödale teadaolev minimaalne õlikogus, mis on vajalik uuritava aine jaotumise ja homogeensuse saavutamiseks söödas; või

— sööda rikastamisel tuleks kasutada sobivat orgaanilist lahustit, kui sellega ei vähendata homogeensust ja biosaadavust (on võimalik, et lahusti aurustumise tagajärjel tekivad söödas uuritava aine (mikro)kristallid, ning ei ole hõlbus tõendada, et seda ei ole toimunud; vt viide 49); või

— mitteviskoossed vedelikud tuleks lisada otse kalasööta, kuid neid tuleks hästi segada, et hõlbustada homogeensuse saavutamist ja aine tõhusat imendumist. Tuleks kasutada segamismeetodit, millega tagatakse rikastatud sööda homogeensus.

▼M7

Mõnel üksikul juhul, näiteks vähem hüdrofoobsete ainete puhul, mis söödast suurema tõenäosusega desorbeeruvad, võib olla vaja kasutada valmistatud söödagraanulite katmiseks väikest kogust maisi- või kalaõli (vt punkt 142). Sel juhul tuleks kontrollrühma sööta töödelda samal viisil ja kasutada lipiidisisalduse mõõtmiseks lõplikult ette valmistatud sööta.

Võrdlusaine kasutamise korral peaksid sellega saadud tulemused olema võrreldavad varem avaldatud andmetega sarnastes tingimustes ja sarnasel söötmisrežiimil tehtud uuringutest (vt punkt 45) ning asjaomase võrdlusainega seotud näitajad peaksid vastama punktis 113 (loetelu kolmas, neljas ja viies taane) esitatud asjakohastele kriteeriumidele.

Kui uuritava aine puhul kasutatakse kandeainena õli või lahustit, tuleks võrreldav kogus sama kandeainet (ilma uuritava aineta) segada ka kontrollrühma söödaga, et tagada selle samaväärsus rikastatud söödaga. Nii omastamis- kui ka puhastumisetapis on oluline anda katserühma(de) ja kontrollrühma kaladele sama toitevääртusega sööta.

Rikastatud sööta tuleks säilitada tingimustes, milles uuritav aine on söödaga segatuna püsiv (nt jahutatult), ja märkida need tingimused katseprotokolli.

Kalaliigi valimine

Võib kasutada veekaudse kokkupuute meetodis määratletud kalaliike (vt punkt 32 ja 3. liide). Enne käesoleva katsemeetodi avaldamist on orgaaniliste ainetega tehtud toidukaudse bioakumuleerumise uuringutes kasutatud tavaliselt vikerforelli (*Oncorhynchus mykiss*), karpkala (*Cyprinus carpio*) ja tüsedat tõmpnina (*Pimephales promelas*). Katsealuse liigi toitumiskäitumine peaks olema selline, et lisatud söödakogus tarbitakse kiirelt ära; sellega tagatakse, et kõikide söödas esineva uuritava aine sisaldust muuta võivate tegurite mõju (nt leostumine vette ja veekaudse kokkupuude võimalus) on minimaalne. Tuleks kasutada soovitatavasse suuruse-/massivahemikku jäävaid kalu (vt 3. liide). Kalad ei tohiks olla nii väikesed, et see takistaks iga kala eraldi analüüsimist. Kiire kasvamise etapis olevate kalade kasutamisel võib andmete tõlgendamine olla raskendatud, samuti võib suur kasvukiirus mõjutada aine imendumistõhususe arvutamist ([1])

Kalade pidamine

Katse eel kohaldatavad kalade kohanemise, suremuse ja haigustega seotud vastuvõetavuse kriteeriumid on samad kui veekaudse kokkupuute meetodi puhul (vt punktid 33–35).

KATSE KÄIK

Katse-eelne analüüs ja kontsentratsioonivahemiku leidmise katse

Enne katse läbiviimist on vaja teha analüüs, millega tõendatakse aine tuvastatavust rikastatud söödast või rikastatud kalakudedest. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse sobiva kontsentratsiooni valimiseks ei ole alati vajalik. Võib teha söötmise eelkatseid, et tõendada täheldatava kahjuliku mõju puudumist, hinnata rikastatud sööda maitse sobivust ja analüüsimeetodi tundlikkust kalakudede ja

([1]) Omastamisetapis toimuva kiire kasvu korral langeb söötmismäär kokkupuute alguses kehtestatud määrast allapoole.

▼M7

sööda puhul, valida sobiv söötmisrežiim ja proovivõtuintervall puhastumisetapis jne; sellised eelkatsed ei ole siiski kohustuslikud. Väärtuslikku teavet võib anda puhastumisetapis võetavate proovide jaoks vajaliku kalade arvu hindamiseks tehtav eeluuring. See võib oluliselt vähendada katses kasutatavate kalade arvu, eriti selliste uuritavate ainete puhul, mis on iseäranis kergesti metaboliseeruvad.

Kokkupuutetingimused

Omastamisetapi kestus

Tavaliselt on omastamisetapi piisav kestus 7–14 päeva, mille jooksul ühele kalade rühmale antakse iga päev kontrollsööta ja teisele katsesööta kindlaksmääratud koguses, mis sõltub katsealusest liigist ja katsetingimustest; näiteks vikerforelli puhul on see 1–2 % kehamassist (märgmassi alusel). Sööda kogus valitakse nii, et ei toimuks kiiret kasvu ega lipiidisisalduse olulist suurenemist. Vajaduse korral võib omastamisetapi kestust pikendada lähtuvalt varasemate uuringutega saadud praktilisest kogemusest või andmetest uuritava aine (või selle analoogi) omastamise või sellest puhastumise kohta kalades. Katse algushetkeks loetakse rikastatud sööda esmakordse lisamise hetke. Katsepäev kestab söötmise ajast kuni ajani veidi (nt üks tund) enne järgmist söötmist. Seega algab esimene katsepäev rikastatud sööda esmakordse lisamise hetkest ja lõpeb veidi enne rikastatud sööda teistkordse lisamise hetke. Praktikas lõpeb omastamisetapp veidi (nt üks tund) enne uuritava ainega rikastamata sööda esmakordset lisamist, kuna sellele eelneva 24 tunni jooksul jätkavad kalad rikastatud sööda seedimist ja uuritava aine absorbeerimist. On oluline tagada, et organismis saavutatakse uuritava aine piisavalt suur sisaldus (mürgisuse ilmnemiseta), et kasutatava analüüsimeetodiga oleks puhastumisetapis võimalik mõõta ka vähemalt ühe suurusjärgu võrra väiksemat aine sisaldust. Erandjuhul võib omastamisetappi pikendada (kuni 28 päevani) ja võtta omastamiskineetika kirjeldamiseks lisaproove. Aine sisaldus kalas ei pruugi omastamisetapi vältel saavutada statsionaarsele olekule vastavat väärtust. Käesoleva meetodi puhul võib statsionaarse oleku saavutamiseks kuluva aja hindamiseks kasutada samu võrrandeid kui veekaudse kokkupuute meetodi puhul, et teha kindlaks eeldatav ajavahemik, mille jooksul aine sisaldus kalas jõuab piisavale tasemele (vt 5. liide).

Mõnel juhul võib olla teada, et analüüsimeetodi vähesest tundlikkusest või väikesest aine imendumise tõhususest tulenevalt ei omasta kalad asjaomase söödas kasutatava kontsentratsiooni puhul ainet 7–14 päeva jooksul piisavalt, et selle sisaldus kalas oleks puhastumisetapis toimuva vähemalt ühe suurusjärgu võrra vähenemise järel määratav. Sellisel juhul võib olla kasulik muuta söötmisetapi algset kestust nii, et see oleks pikem kui 14 päeva; teise võimalusena tuleks kaaluda aine sisalduse suurendamist söödas, eelkõige kiirelt metaboliseeruvate ainete puhul. Tuleks siiski jälgida, et omastamisetapis jääks aine sisaldus kalakudedes väiksemaks kui (eeldatav) täheldatava kroonilise toime puudumise kontsentratsioon (vt punkt 138).

Puhastumisetapi kestus

Puhastumine kestab üldjuhul kuni 28 päeva ja algab hetkel, mil katserühma(de) kaladele hakatakse omastamisetapi järel andma puhast töötlemata sööta. Puhastumine ei alga kohe pärast viimast söötmist rikastatud söödaga, vaid esimesel rikastamata söödaga söötmisel, kuna sellele eelneva 24 tunni jooksul jätkavad kalad sööda seedimist ja uuritava aine absorbeerimist, nagu on märgitud punktis 126. Seepärast võetakse puhastumisetapis esimene proov veidi enne teistkordset söötmist rikastamata söödaga. Nimetatud puhastumisperiood on ette nähtud

▼M7

selliste ainete uurimiseks, mille eeldatav poolväärtusaeg on kuni 14 päeva – nagu see on bioakumuleeruvatel ainetel ([1]) – ja mille puhul 28 päeva sisse mahub kaks poolväärtusaega. Väga bioakumuleeruvate ainete puhul võib olla kasulik puhastumisetapi kestust pikendada (kui see on eelkatsete põhjal vajalik).

Kui ainest puhastumine on väga aeglane ja täpset poolväärtusaega ei saa puhastumisetapis kindlaks teha, võib saadav teave olla hindamiseks siiski piisav ja viidata ulatuslikule bioakumuleerumisele. Kui aga ainest puhastumine on nii kiire, et ei ole võimalik usaldusväärselt leida aine sisaldust alghetkel ($C_{0,d}$ – kontsentratsioon omastamisetapi lõpus / puhastumisetapi alguses) ja k_2 väärtust, võib arvutada konservatiivse hinnangu kohase k_2 väärtuse (vt 7. liide).

Kui kalade analüüsimisest mõnel varasemal ajahetkel (nt 7 või 14 päeva järel) nähtub, et aine sisaldus on langenud enne täispika 28-päevase puhastumisetapi lõppu määramispiirist allapoole, võib järgnevad proovid võtmata jätta ja katse lõpetada.

Mõnel üksikul juhul ei pruugi omastamisperioodi lõpuks (või puhastumisetapis teise proovi võtmise ajaks) olla toimunud aine omastamist mõõdetavas koguses. Kui on võimalik tõendada, et i) punktis 113 esitatud nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud ja ii) mitteomastamine ei tulene katsemeetodiga seotud muudest puudustest (nt omastamisetapi ebapiisav kestus, sööda rikastamise meetodi puudulikkusest põhjustatud vähene biosaadavus, analüüsimeetodi liiga väike tundlikkus, asjaolu, et kalad ei tarbi sööta, vms), võib olla võimalik katse lõpetada, ilma et oleks vaja teha pikema omastamisperioodiga korduskatset. Kui eelanalüüsist nähtub, et tegemist võib olla sellise juhuga, võib olla soovitatav võimaluse korral analüüsida massibilansil põhineva lähenemisviisi raames väljaheiteid seedimata uuritava aine suhtes.

Katsealuste kalade arv

Nagu veekaudse kokkupuute katse puhul, tuleks siingi valida katsesse sarnase massi ja pikkusega kalad, nii et kõige väiksemate kalade mass oleks vähemalt kaks kolmandikku kõige suuremate kalade massist (vt punktid 40–42).

Uuringus kasutatavate kalade üldarvu kindlaksmääramisel tuleks lähtuda proovivõtukavast (vähemalt üks proov omastamisetapi lõpus ja neli kuni kuus proovi puhastumisetapi vältel, ent sõltuvalt nende etappide kestusest) ning võtta arvesse analüüsimeetodi tundlikkust, omastamisetapi lõpuks eelduste kohaselt saavutatavat sisaldust (varasemate andmete alusel) ja puhastumisetapi kestust (kui varasemad andmed võimaldavad seda hinnata). Igal proovivõtmisel tuleks valida viis kuni kümme kala ning mõõta enne kemikaali või lipiidide sisalduse määramist kasvu iseloomustavad näitajad (mass ja üldpikkus).

Tulenevalt suuruse, kasvukiiruse ja füsioloogiliste näitajate loomulikust varieeruvusest kalade hulgas ning iga kala tarbitava söödakoguse tõenäolisest varieeruvusest tuleks igal proovivõtmisel valida katserühmast vähemalt viis kala ja kontrollrühmast samuti vähemalt viis kala, et oleks võimalik teha nõuetekohaselt kindlaks aine sisalduse keskväärtus ja varieeruvus. Kasutatavate kalade hulgas täheldatav varieeruvus moodustab katses esinevast üldisest kontrollimatust varieeruvusest tõenäoliselt suurema osa kui kohaldatavatele analüüsimeetoditele omane varieeruvus, mistõttu mõnel juhul on põhjendatud kuni kümne kala kasutamine igas proovivõtupunktis. Kui uuritava aine taustsisaldus kontrollrühma kalades ei ole puhastumisetapi alguses tuvastatav, võib piisata kemikaali määramisest vaid kahes-kolmes kontrollrühma kalas üksnes viimases proovivõtupunktis, eeldusel, et kontrollrühma ülejäänud kaladel mõõdetakse kõikides proovivõtupunktides mass ja üldpikkus (nii et kasvu hindamiseks valitakse katserühma(de)s ja kontrollrühmas proovi sama arv kalu). Kalu tuleks säilitada ning mõõta eraldi iga kala mass ja üldpikkus (ka juhul, kui proovide andmed on vaja hiljem ühte koondada).

([1]) Veekaudse kokkupuute katses on 14 päeva pikkusele poolväärtusajale vastav BCFi väärtus 1 g kaaluvate kalade kasutamisel umbes 10 000 l/kg ja vastav omastamiskiirus umbes 500 l/kg päevas (vastavalt võrrandile, mille on avaldanud Sijm *et al.* (46)).

▼M7

See tähendab, et standardkatse puhul, kus kasutatakse näiteks 28 päeva pikkust puhastumisetappi ja selle aja jooksul võetakse viis proovi, valitakse katserühmast kokku 59–120 kala ja kontrollrühmast 50–110 kala, kui aine analüüsimise meetod võimaldab määrata samal kalal ka lipiidisisalduse. Kui samal kalal ei ole võimalik määrata korraga nii lipiidide kui ka kemikaali sisaldust ja lipiidisisalduse määramine üksnes kontrollrühma kaladel ei ole samuti teostatav (vt punkt 56), läheb vaja veel 15 kala (kolm kala lähtepopulatsioonist katse alguses ning kontrollrühmast ja katserühmast kummastki kolm kala nii puhastumisetapi alguses kui ka katse lõpus). Proovivõtmise näidisajakava koos kalade arvuga on esitatud 4. liites.

Biomassisisaldus

Ühe kala kohta tuleks kasutada samasugust suurt veekogust nagu veekaudse kokkupuute meetodi puhul (vt punktid 43 ja 44). Ehkki käesoleva katsemeetodi puhul ei sõltu kokkupuutekontsentratsioon ühe kala kohta kasutatavast veekogusest, on lahustunud hapniku nõuetekohase sisalduse säilitamise ja katseorganismide stressi minimeerimise huvides soovitatav lisatav kalade kogus 0,1–1,0 g (märgmass) liitri vee kohta päevas.

Katsesööt ja söötmine

Kohanemisperioodi jooksul tuleks kalu sööta eespool kirjeldatud sobiva söödaga (punkt 117). Kui katse tehakse läbivoolurežiimis, tuleks veevool kalade söötmise ajaks peatada.

Katse ajal tuleks katserühma(de)s kasutada eespool kirjeldatud sööta (punktid 116–121). Soovitud rikastamisjärgse kontsentratsiooni valimisel tuleks peale konkreetse uuritava ainega seotud tegurite, analüüsimeetodi tundlikkuse, asjaomaste keskkonnatingimuste juures söödas saavutatava eeldatava sisalduse ja organismis kroonilise mürgisuse avaldumise kontsentratsiooni võtta arvesse ka sööda maitseomadusi (et kalad ei hoiduks seda söömast). Rikastamisel saavutatav uuritava aine nominaalne kontsentratsioon tuleks esitada katseprotokollis. Kogemustest ilmneb, et selliste uuritavate ainete puhul, millel puudub konkreetne mürgisuse avaldumise mehhanism, jääb praktikas kasutatav rikastamisjärgne kontsentratsioon vahemikku 1–1 000 μg/g. Mittespetsiifilise toimemehhanismiga ainete puhul ei tohiks ainejääkide sisaldus kudedes olla suurem kui 5 μmol grammi lipiidide kohta, kuna on tõenäoline, et sellest suurema jääkide sisalduse juures ilmneb aine krooniline mõju (19, 48, 50) ([1]). Muude ainete puhul tuleks jälgida, et kumulatiivne kokkupuude ei põhjustaks mingit kahjulikku mõju (vt punkt 127). Seda tuleb eriti silmas pidada juhul, kui katses kasutatakse üheaegselt mitut ainet (vt punkt 112).

Kalasööda rikastamiseks sobiva koguse uuritava ainega võib kasutada ühte kolmest meetodist, mida on kirjeldatud punktis 119 ja 7. liites. Sööda rikastamiseks kasutatud meetodid tuleks esitada katseprotokollis. Kontrollrühma kalu söödetakse töötlemata söödaga, mis sisaldab sobivas koguses õli, kui seda kasutatakse kandeainena omastamisetapis antavas rikastatud söödas, või uuritava aineta lahustit, kui katserühma sööda valmistamisel kasutatakse kandeainena lahustit. Töödeldud ja töötlemata söödas tuleks uuritava aine sisaldus määrata analüütiliselt enne omastamisetapi algust ja selle lõpus vähemalt kolmes paralleelis. Pärast kokkupuudet töödeldud söödaga (omastamisetapp) söödetakse kummagi rühma kalu töötlemata söödaga (puhastumisetapp).

Kalade söötmisel kasutatakse kindlaksmääratud söödakogust (sõltuvalt liigist; näiteks vikerforelli puhul on see umbes 1–2 % kala märgmassist päevas). Sööda kogus valitakse nii, et ei toimuks kiiret kasvu ega lipiidisisalduse olulist suurenemist. Katses kasutatud täpne söötmisrežiim tuleks registreerida. Algselt tuleks söötmisel aluseks võtta lähtepopulatsioonis vahetult enne katse algust tehtud plaanilise kaalumise tulemused. Sööda kogust tuleks muuta lähtuvalt

([1]) Kuna aine tegelikku sisaldust organismis on võimalik mõõta alles pärast katse läbiviimist, on vaja leida aine hinnanguline eeldatav sisaldus organismis (näiteks lähtuvalt eeldatavast BMFst ja aine sisaldusest söödas; vt 5. liide, võrrand A5.8).

▼M7

igal proovivõtmisel valitud kalade märgmassist, et võtta arvesse kalade kasvu katse vältel. Katse- ja kontrollnõudes olevate kalade massi ja pikkust saab hinnata igal proovivõtmisel valitud kalade massi ja üldpikkuse põhjal; katse- ja kontrollnõudesse jäänud kalu ei kaaluta ega mõõdeta. On oluline kasutada kogu katse vältel sama kindlaksmääratud söötmisrežiimi.

Söömist tuleks vaadelda, et olla kindel, et kalad tarbivad nähtavalt ära kogu lisatud sööda ja et sellest tulenevalt kasutatakse arvutustes õiget sööda tarbimise määra. Sellise söötmisrežiimi valimisel, mille puhul on tagatud kord päevas antava sööda täielik äratarbimine, tuleks tugineda söötmise eelkatsete tulemustele või varasemale kogemusele. Kui sööt jäetakse pidevalt söömata, võib olla soovitatav hajutada iga katsepäeva söödakogust ühe söötmiskorra lisamisega (näiteks asendada kord päevas toimuv söötmine kaks korda päevas toimuva poole väiksema koguse söötmisega). Sellise vajaduse korral peaks teine söötmine toimuma kindlal kellaajal ja olema ajastatud nii, et ajavahemik söötmisest kalaproovi võtmiseni on võimalikult pikk (näiteks toimub teine söötmine katsepäeva esimeses pooles).

Ehkki üldjuhul tarbivad kalad sööda kiiresti ära, on oluline tagada, et aine jääks söödale adsorbeerunuks. Tuleks teha jõupingutusi, et hoida ära uuritava aine dispergeerumist söödast vette ja sellest tulenevat kalade veekaudset kokkupuudet uuritava ainega lisaks toidukaudsele kokkupuutele. Seda on võimalik saavutada nii, et kogu söömata jäänud sööt (ja väljaheited) eemaldatakse katse- ja kontrollnõudest ühe tunni, kuid soovitatavalt 30 minuti jooksul pärast söötmist. Peale selle võib kasutada süsteemi, mille puhul vett puhastatakse pidevalt aktiivsöefiltri abil, mis absorbeerib kõik „lahustunud“ saasteained. Abi võib olla ka läbivoolusüsteemist, kus toiduosakesed ja lahustunud ained uhutakse kiiresti välja ([1]). Mõnel juhul võivad aidata seda probleemi leevendada väikesed muudatused rikastatud sööda valmistamise meetodis (vt punkt 119).

Valgus ja temperatuur

Nagu veekaudse kokkupuute meetodis (vt punkt 48), soovitatakse siingi kasutada 12–16 tunni pikkust valgustusperioodi ja katsealuse liigi jaoks sobivat temperatuuri (± 2 °C) (vt 3. liide). Kasutatava valguse liik ja omadused peaksid olema teada ja need tuleks registreerida.

Kontrollid

Tuleks kasutada ühte kontrollrühma, mille kaladele antakse sama kogus sööta kui katserühma kaladele, kuid mille söödas puudub uuritav aine. Kui katserühma sööda rikastamisel kasutatakse kandeainena lahustit, tuleks kontrollrühma sööta töödelda täpselt samal viisil, kuid ilma uuritava aineta, nii et nende rühmade sööt oleks võrreldava koostisega (vt punktid 121 ja 139).

([1]) Uuritava aine esinemist katselahuses kaladest eritumise või söödast leostumise tõttu ei pruugi olla võimalik täielikult ära hoida. Seepärast on üks võimalus määrata aine sisaldus vees omastamisetapi lõpus, eriti poolstaatilise režiimi kasutamise korral, et aidata kindlaks teha, kas veekaudne kokkupuude on aset leidnud.

▼M7

Vee kvaliteediga seotud mõõtmiste sagedus

Veekaudse kokkupuute meetodis kirjeldatud tingimusi kohaldatakse ka siin; ainsa erinevusena on orgaanilise süsiniku üldsisaldust vaja mõõta üksnes katse eel katsevee iseloomustamise käigus (vt punkt 53).

Kala- ja söödaproovide võtmine ja analüüs

Söödaproovide analüüs

Katse- ja kontrollsööda proovides tuleks uuritava aine ja lipiidide sisaldus määrata vähemalt enne omastamisetapi algust ja selle lõpus vähemalt kolmes paralleelis. Sööda homogeensuse tagamiseks kasutatud analüüsimeetodid tuleks esitada katseprotokollis.

Uuritava aine analüüsimiseks proovis tuleks kasutada üldlevinud valideeritud meetodit. Enne katse alustamist tuleks teha eeluuringud, et selgitada välja määramispiir, protsentuaalne tuvastamise tõhusus, segavad tegurid ja analüütiliselt tuvastatav varieeruvus kavandatavas proovi materjalis. Kui katses kasutatakse radioaktiivselt märgistatud ainet, tuleks lähtuda samadest kaalutlustest kui veekaudse kokkupuute meetodis, ainult et vee analüüsimise asemel analüüsitakse sööta (vt punkt 65).

Kalaproovide analüüs

Igal kalaproovide võtmisel valitakse uuritava ainega kokku puutuvast rühmast ja kontrollrühmast 5–10 isendit (mõnel juhul võib kontrollrühma kalade arv olla väiksem; vt punkt 134).

Proovivõtmine peaks igal katsepäeval toimuma samal ajal (söötmisajaga võrreldes) ja olema ajastatud nii, et omastamisetapi ajal ja puhastumisetapi algusjärgus oleks soolestikku jäänud toidu esinemise tõenäosus võimalikult väike ning uuritava aine üldsisalduse andmetes ei oleks seepärast vaja kahelda (st proovivõtmiseks valitud kalad tuleks eemaldada katsepäeva lõpus; seejuures tuleks meeles pidada, et katsepäev algab söötmise hetkel ja lõpeb järgmise söötmise hetkel umbes 24 tundi hiljem; puhastumine algab rikastamata sööda esmakordse lisamise hetkel; vt punkt 128). Puhastumisetapi esimene proov, mis võetakse veidi enne teistkordset rikastamata söödaga söötmist, on oluline põhjusel, et sellest mõõtmisest ühe päeva võrra tagasi ekstrapoleerimise teel leitakse aine eeldatav sisaldus alghetkel ($C_{0,d}$ – kontsentratsioon kalas omastamisetapi lõpus / puhastumisetapi alguses). Soovi korral võib omastamisetapi lõpus ning puhastumisetapi esimesel ja kolmandal päeval eemaldada kala seedekulgla ja seda eraldi analüüsida.

Kalad tuleks igal proovivõtmisel kummagi rühma nõudest eemaldada ja käidelda neid samal viisil, nagu on kirjeldatud veekaudse kokkupuute meetodis (vt punktid 61–63).

Nii katse- kui ka kontrollrühmas mõõdetakse uuritava aine sisaldust terves kalas (märgmassi alusel) vähemalt omastamisetapi lõpus ja puhastumisetapi kestel. Puhastumisetapis soovitatakse võtta proove neljal kuni kuuel korral (nt 1, 3, 7, 14 ja 28 päeva möödudes). Soovi korral võib 1–3 päeva kestnud omastamise järel võtta ühe lisaproovi, et hinnata imendumistõhusust kokkupuute algusjärgu põhjal, mil aine omastamine kalades on lineaarne. Kaks peamist võimalikku kõrvalekaldumist proovivõtukavast on järgmised: i) kui omastamisetappi pikendatakse, et analüüsida omastamiskineetikat, võetakse omastamisetapis proove sagedamini ja seega tuleb katses kasutada suuremat arvu kalu (vt punkt 126); ii) katse lõpetatakse omastamisetapi lõpus, kuna ainet ei ole mõõdetavas koguses

▼M7

omastatud (vt punkt 131). Kasvu kiiruskonstandi leidmiseks tuleks mõõta iga proovivõtmiseks valitud kala mass (ja üldpikkus). Omastamisetapi lõpus ja puhastumisetapi valitud aegadel võib määrata ka aine sisalduse konkreetsetes kalakudedes (söödav ja mittesöödav osa). Kui katses kasutatakse radioaktiivselt märgistatud ainet, tuleks lähtuda samadest kaalutlustest kui veekaudse kokkupuute meetodis, ainult et vee analüüsimise asemel analüüsitakse sööta (vt punkt 65).

Kui aeg-ajalt kasutatakse võrdlusainet (vt punkt 25), on katserühmas soovitatav määrata selle sisaldus omastamisetapi lõpus ja kõikides uuritava aine puhul kasutatavates puhastumisetapi proovivõtupunktides (terve kala alusel); kontrollrühmas on võrdlusaine sisaldus vaja määrata üksnes omastamisetapi lõpus (terve kala alusel). Teatavas olukorras (näiteks kui uuritava aine ja võrdlusaine puhul kasutatavad analüüsimeetodid on omavahel sobimatud ja proovivõtukavast kinni pidamiseks tuleks kasutada suuremat arvu kalu) võib täiendavalt vaja minevate kalade arvu minimeerimiseks kasutada teistsugust lähenemisviisi: võrdlusaine sisaldust mõõdetakse üksnes puhastumisetapis selle esimesel ja kolmandal päeval ning veel kahes proovivõtupunktis, mis on valitud nii, et oleks võimalik usaldusväärselt hinnata võrdlusaine sisaldust alghetkel ($C_{0,d}$) ja võrdlusaine k_2.

Võimaluse korral tuleks igal proovivõtmisel või vähemalt omastamisetapi alguses ja lõpus ning puhastumisetapi lõpus määrata iga kala lipiidisisaldus (vt punktid 56 ja 67). Kasutatavast analüüsimeetodist sõltuvalt (vt punkt 67 ja 4. liide) võib olla võimalik kasutada lipiidisisalduse ja uuritava aine sisalduse määramiseks sama kala. See on kalade arvu minimeerimise seisukohast soovitatav. Kui see ei ole aga võimalik, võib kasutada lähenemisviisi, mida on kirjeldatud veekaudse kokkupuute meetodis (kõnealuseid alternatiivseid võimalusi lipiidisisalduse mõõtmiseks on käsitletud punktis 56). Lipiidisisalduse kvantifitseerimiseks kasutatud meetod tuleks esitada katseprotokollis.

Analüüsimeetodi kvaliteet

Tuleks katseliselt veenduda, et konkreetse aine analüüsimise meetodi spetsiifilisus, mõõtetäpsus ja kordustäpsus ning tulemuste reprodutseeritavus, samuti uuritava aine tuvastamise tõhusus sööda- ja kalaproovides on piisavad.

Kalade kasvu mõõtmine

Katse alguses tuleb määrata lähtepopulatsioonist võetud proovis olevate kalade mass ja üldpikkus. Kõnealune proov tuleks võtta veidi (nt üks tund) enne esmakordset rikastatud söödaga söötmist ja lugeda see võetuks katse nullpäeval. Kalade arv selles proovis peaks olema vähemalt sama suur kui katse vältel võetavates proovides. Mõni neist kaladest võib olla seesama, keda kasutatakse lipiidisisalduse määramiseks enne omastamisetapi algust (vt punkt 153). Igal proovivõtmisel mõõdetakse kõigepealt kalade mass ja pikkus. Iga üksiku proovivõtmiseks valitud kala puhul tuleks mõõdetud mass ja pikkus kokku viia määratud uuritava kemikaali sisaldusega (ja vajaduse korral lipiidisisaldusega), näiteks kordumatu tunnuskoodi abil. Kõnealustel valitud kaladel mõõdetud väärtusi saab kasutada katse- ja kontrollnõudesse jäänud kalade massi ja pikkuse hindamiseks.

Vaatlused katse ajal

Iga päev tuleks vaadelda suremust ja andmed registreerida. Tuleks teha lisavaatlusi kahjuliku mõju, näiteks ebanormaalse käitumise või pigmenteerumise tuvastamiseks ning tulemused registreerida. Kala loetakse surnuks, kui tal ei täheldata hingamisliigutusi ja ta ei reageeri nõrgale mehaanilisele ärritajale. Kõik surnud või selgelt surmaeelses seisundis kalad tuleks eemaldada.

▼M7

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete töötlemine

Katse tulemusi kasutatakse puhastumise kiiruskonstandi (k_2) leidmiseks kalade märgmassi põhjal. Kalade massi suurenemise keskmisest määrast lähtuvalt arvutatakse kasvu kiiruskonstant k_g, mida vajaduse korral kasutatakse kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandi k_{2g} leidmiseks. Peale selle tuleks esitada imendumistõhusus (absorbeerumine soolestikus; a), kineetiline biokuhjumistegur (BMF_K) (vajaduse korral kasvu suhtes korrigeerituna – BMF_{Kg}), selle väärtus lipiidisisalduse suhtes korrigeerituna (BMF_{KL}) või nii kasvu kui ka lipiidisisalduse suhtes korrigeerituna (BMF_{KgL}) ning söödatarbimise kiirus. Samuti võib juhul, kui on võimalik hinnata statsionaarse oleku saavutamiseks kuluvat aega (nt 95 % statsionaarsele olekule vastavast väärtusest ehk t_{95} = 3,0 / k_2), esitada ka statsionaarsele olekule vastava BMFi (BMF_{SS}) hinnangulise väärtuse (vt punktid 105 ja 106 ning 5. liide), kui t_{95} väärtusest nähtub, et katses võidi saavutada statsionaarne olek. Kõnealuse BMF_{SS}-i puhul tuleks lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud väärtuse (BMF_{SSL}) saamiseks korrigeerida seda lipiidisisalduse suhtes samal viisil kui kineetilist BMF-i (BMF_K) (tuleb märkida, et statsionaarsele olekule vastava BMF-i korrigeerimiseks kasvust tingitud lahjenemise suhtes puudub kokkulepitud metoodika). Valemid ja näidisarvutused on esitatud 7. liites. On välja töötatud lähenemisviisid, mis võimaldavad hinnata kineetilise biokontsentratsiooniteguri (BCF_K) väärtust lähtuvalt toidukaudse kokkupuute uuringu andmetest. Seda on käsitletud 8. liites.

Kalade massi- ja pikkuse andmed

Igal perioodil mõõdetud iga kala märgmass ja pikkus kantakse tabelisse iga omastamisetapi proovivõtupäeva ning katserühma(de) ja kontrollrühma kohta eraldi (lähtepopulatsiooni andmed omastamisetapi alguses; kontrollrühma ja katserühma(de) andmed omastamisetapi lõpus ning vastavate proovide olemasolu korral omastamisetapi algusjärgus (nt 1.–3. päeval) ja puhastumisetapis (nt 1., 2., 4., 7., 14. ja 28. päeval)). Kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeerimisel tuleks kasvunäitajana eelistatavalt kasutada massi. Meetod(id), mida kasutatakse andmete korrigeerimiseks kasvust tingitud lahjenemise suhtes, on esitatud allpool punktides 162 ja 163 ning 5. liites.

Andmed uuritava aine sisalduse kohta kalas

Katserühma(de) ja kontrollrühma igas kalas (või kui igas kalas eraldi määramine ei ole võimalik, siis kalade koondproovis) tehtud uuritava aine jääkide mõõtmise tulemused, mis on väljendatud sisaldusena massiühikutes märgmassi ühiku kohta, kantakse tabelisse iga proovivõtukorra kohta. Kui iga proovivõtmiseks valitud kala on analüüsitud lipiidisisalduse suhtes, saab iga kala kohta leida ja tabelisse kanda lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud sisalduse, mis arvutatakse lähtuvalt lipiidide massiosast.

— Igas kalas (või kui igas kalas eraldi määramine ei ole võimalik, siis kalade koondproovis; vt punkt 66) tehtud uuritava aine jääkide mõõtmise tulemused puhastumisperioodi kohta naturaallogaritmitakse ja kantakse graafikule päevades väljendatud aja funktsioonina. Kui graafiku visuaalsel hindamisel täheldatakse selgelt võõrväärtuste esinemist, võib kahtlaste andmepunktide väljajätmiseks kasutada statistiliselt usaldusväärset võõrväärtuste testi ja esitada dokumenteeritud põhjenduse selliste andmepunktide väljajätmise kohta.

— Vähimruutude meetodil arvutatakse naturaallogaritmitud kontsentratsiooni ja päevades väljendatud puhastumisaja lineaarne korrelatsioon. Saadud sirge tõus ja algordinaat esitatakse puhastumise üldise kiiruskonstandina (k_2) ja naturaallogaritmitud eeldatava sisaldusena alghetkel ($C_{0,d}$) (üksikasjalikum teave on esitatud 5. ja 7. liites). Kui see ei ole võimalik, sest aine sisaldus on puhastumisetapi teises proovis langenud määramispiirist allapoole, võib leida k_2 konservatiivse hinnangulise väärtuse (vt 7. liide).

— Standardsete statistiliste meetoditega arvutatakse sirge tõusu ja algordinaadi väärtuste hajuvus ning leitakse ja esitatakse tulemuste usaldusvahemik usaldusnivool 90 % (või 95 %).

▼M7

— Samuti arvutatakse omastamisetapi viimasel päeval kalades mõõdetud aine sisalduse ($C_{0,m}$ – mõõdetud sisaldus alghetkel) keskväärtus ja võrreldakse seda eeldatava väärtusega $C_{0,d}$. Kui eeldatav väärtus on väiksem kui mõõdetud väärtus, võib see viidata seedimata jäänud rikastatud sööda esinemisele soolestikus. Kui eeldatav väärtus on mõõdetud väärtusest väga palju suurem, võib see viidata asjaolule, et puhastumisandmete lineaarse regressiooni teel leitud väärtus ei ole õige ja seda tuleks uuesti hinnata (vt 7. liide).

Puhastumiskiirus ja biokuhjumistegur

Katseandmete alusel biokuhjumisteguri arvutamiseks tuleks kõigepealt leida imendumistõhusus (uuritava aine absorbeerumine soolestikus; α). Selleks tuleks kasutada 7. liites esitatud võrrandit A7.1, mille puhul on vaja teada aine eeldatavat sisaldust kalades puhastumisetapi alghetkel ($C_{0,d}$), (üldist) puhastumise kiiruskonstanti (k_2), aine sisaldust söödas ($C_{sööt}$), söödatarbimise kiiruskonstanti (I) ja omastamisetapi kestust (t). Nagu eespool kirjeldatud, esitatakse naturaallogaritmitud kontsentratsiooni ja puhastumisaja lineaarse korrelatsiooni sirge tõus ja algordinaat puhastumise üldise kiiruskonstandina (k_2 = tõus) ja sisaldusena alghetkel ($C_{0,d} = e^{algordinaat}$). Tuleks kontrollida saadud väärtuste bioloogilist usutavust (näiteks ei tohiks osakaaluna väljendatav imendumistõhusus olla suurem kui 1). I leidmiseks jagatakse iga päev kaladele antava sööda mass kalade summaarse massiga (kui sööda kogus on 2 % kehamassist, on I väärtus 0,02). Arvutamisel kasutatavat söötmismäära võib siiski olla vaja kohandada, et võtta arvesse kalade kasvu (kalade massi hindamiseks omastamisetapi igal ajahetkel võib kasutada teadaolevat kasvu kiiruskonstanti; vt 7. liide). Kui k_2 ja $C_{0,d}$ leidmine ei ole võimalik, näiteks seetõttu, et aine sisaldus on puhastumisetapi teises proovis langenud määramispiirist allapoole, võib arvutada k_2 ja maksimaalse BMF_k konservatiivse hinnangulise väärtuse (vt 7. liide).

Pärast imendumistõhususe (α) leidmist saab biokuhjumisteguri arvutamiseks korrutada α söödatarbimise kiiruskonstandiga (I) ja jagada puhastumise (üldise) kiiruskonstandiga (k_2). Kasvu suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur arvutatakse samal viisil, ent sel juhul kasutatakse kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstanti (k_{2g}; vt punktid 162 ja 163). Teise võimalusena saab imendumistõhusust hinnata omastamisetapi varases, lineaarse omastamise järgus võetud kalakudede analüüsi põhjal; vt punkt 151 ja 7. liide. Nii saadakse sõltumatu hinnanguline imendumistõhususe väärtus, mis iseloomustab organismi, kes ei ole sisuliselt ainega veel kokku puutunud (st kaladel on omastamisetapi algusest möödunud vähe aega). BMFi leidmiseks kasutatakse tavaliselt puhastumisandmete põhjal hinnatud imendumistõhusust.

Lipiidisisalduse ja kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeerimine

Kalade kasv puhastumisetapi jooksul võib vähendada kalades mõõdetavat aine sisaldust, mistõttu puhastumise üldise kiiruskonstandi k_2 väärtus võib olla suurem kui väärtus, mis tuleneb üksnes aine kõrvaldamisest näiteks metabolismi ja roojamise käigus (vt punkt 72). Katserühma kalade lipiidisisaldus (millel on tugev seos hüdrofoobsete ainete bioakumuleerumisega) ja sööda lipiidisisaldus võib praktikas nii palju varieeruda, et biokuhjumisteguri esitamiseks mõtestatud kujul on vaja seda korrigeerida. Biokuhjumistegurit tuleks korrigeerida kasvust tingitud lahjenemise suhtes (samuti kui veekaudse kokkupuute meetodi puhul korrigeeritakse kineetilist BCFi) ning lipiidisisalduse suhtes lähtuvalt sööda ja kalade lipiidisisalduse suhtarvust (lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise tegur). Selliste arvutuste jaoks kasutatavad võrrandid ja asjakohased näited on esitatud vastavalt 5. ja 7. liites.

Kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeerimiseks tuleks arvutada kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant (k_{2g}; võrrandid on esitatud 5. liites). Seejärel leitakse kõnealuse konstandi k_{2g} abil kasvu suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur samal viisil, nagu on kirjeldatud punktis 73. Mõnel juhul ei ole sellise lähenemisviisi kasutamine võimalik. Teise lähenemisviisina, mis ei nõua

▼M7

korrigeerimist kasvust tingitud lahjenemise suhtes, kasutatakse puhastumisandmetena mitte tavapärast uuritava aine massi kala massiühiku kohta (kontsentratsioon), vaid uuritava aine massi kala kohta (terve kala alusel). See peaks olema hõlpsalt teostatav, kuna käesoleva katsemeetodi kohaste katsete puhul peaks aine registreeritud sisaldus iga üksiku kala kudedes olema seostatav asjaomase kala massiga. Lihtsat meetodit selle lähenemisviisi kasutamiseks on tutvustatud 5. liites. Tuleb meeles pidada, et ka kõnealuse alternatiivse lähenemisviisi puhul tuleks leida ja esitada k_2 väärtus.

Kui lipiidisisaldust ei ole määratud kõikides proovivõtmiseks valitud kalades, arvutatakse sööda ja kalade lipiidisisalduse suhtes korrigeerimiseks lipiidide keskmine massiosa kalades ja söödas ([1]). Seejärel leitakse lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise tegur (L_c) kalas sisalduvate lipiidide keskmise osakaalu jagamisel söödas sisalduvate lipiidide keskmise osakaaluga. Lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud biokuhjumisteguri arvutamiseks jagatakse korrigeerimata või vajaduse korral kasvu suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise teguriga.

Kui igas proovivõtupunktis on nii kemikaali kui ka lipiidide sisaldus määratud samal kalal, võib lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud BMFi arvutada otse asjaomase kala lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud koeandmete põhjal (vt viide 37). Lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud kontsentratsiooniandmete graafik võimaldab leida k_2 ja lipiidisisaldusest lähtuva $C_{0,d}$. Sellele järgnevas matemaatilises analüüsis võib kasutada 7. liites esitatud võrrandeid selle erinevusega, et imendumistõhususe (a) arvutamiseks kasutatakse lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud söödatarbimise kiiruskonstanti (I_{lipiid}) ja lipiidisisaldusest lähtuvat aine sisaldust söödas ($C_{\text{sööt-lipiid}}$). Seejärel kasutatakse lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud väärtusi samal viisil, et leida BMF (tuleb meeles pidada, et nii lipiidisisalduse kui ka kasvu suhtes korrigeeritud BMF_{KgL} arvutamiseks tuleks kasvu kiiruskonstandiga korrigeerimisel samuti lähtuda kala märgmassi asemel lipiidide osakaalust).

Tulemuste tõlgendamine

Mürgise toime välistamiseks ei tohiks keskmine kasvukiirus kontrollrühmas ja katserühma(de)s olla märkimisväärselt erinev. Kõnealuse kahe rühma kalade kasvu kiiruskonstantide või kasvukõverate võrdlemiseks tuleks kasutada sobivat meetodit ([2]).

Katseprotokoll

Pärast katse lõppemist koostatakse katse lõpp-protokoll, mis sisaldab punktis 81 loetletud teavet uuritava aine, katsealuse liigi ja katsetingimuste kohta (nagu veekaudse kokkupuute meetodi puhul). Peale selle on nõutav järgmine teave.

Uuritav aine:

— kõik andmed uuritava aine püsivuse kohta valmistatud söödas.

([1]) Seda lähenemisviisi kasutatakse üksnes toidukaudse kokkupuute puhul ja see erineb veekaudse kokkupuute puhul järgitavast meetodist, mistõttu segaduse vältimiseks on mõiste „normaliseerimine“ asemel kasutatud mõistet „korrigeerimine“ – vt ka joonealune märkus punktis 106.

([2]) Kasvu kiiruskonstantide puhul võib kohaldada *t*-testi, et kontrollida, kas kasv kontroll- ja katserühma(de)s on erinev; dispersioonanalüüsi puhul võib kasutada *F*-testi. Vajaduse korral võib sobiva kasvumudeli valimise hõlbustamiseks kasutada *F*-testi või tõepärasuhte testi (OECD monograafia 54 (32)).

▼M7

Katsetingimused:

— aine nominaalne sisaldus söödas, rikastamismeetod, sööda rikastamisel kasutatud (lipiidse) kandeaine kogus (kui on kasutatud), uuritava aine mõõdetud sisaldus rikastatud söödas igal mõõtmiskorral (vähemalt kolm paralleeli enne katse algust ja omastamisetapi lõpus) ja vastavad keskväärtused;

— sööda rikastamise juures kandeainena õli või lahusti kasutamise korral selle liik ja kvaliteet (puhtusaste, tarnija jne);

— kasutatud sööda liik (Weende analüüsi ([1]) andmed, klass või kvaliteet, tarnija jne), söötmisrežiim omastamisetapis, antud sööda kogus ja söötmissagedus (sealhulgas kõik muudatused lähtuvalt proovivõtmiseks valitud kalade massist);

— kemikaali analüüsimiseks kalade kogumise ja humaanse surmamise aeg igas proovivõtupunktis (näiteks üks tund enne järgmise päeva söötmiskorda).

Tulemused:

— kõikide tehtud eeluuringute tulemused;

— teave mis tahes täheldatud kahjuliku mõju kohta;

— kemikaali analüüsimise meetodite täielik kirjeldus, sealhulgas avastamis- ja määramispiir, meetodist tulenev varieeruvus ning tuvastamise tõhusus;

— söödas (rikastatud ja kontrollsöödas) mõõdetud lipiidisisalduse üksikväärtused, keskväärtus ja standardhälve;

— tabeli kujul esitatud andmed nii kontrollrühma kui ka katserühma(de) kalade massi (ja pikkuse) kohta, mis on seostatud konkreetse kalaga (näiteks igale kalale antud kordumatu tunnuskoodi abil), ning arvutuskäik kasvu kiiruskonstandi ja usaldusnivoole 95 % vastava usaldusvahemiku leidmiseks;

— tabeli kujul esitatud andmed uuritava aine sisalduse kohta kalas, omastamisetapi lõpus mõõdetud sisalduse keskväärtus ($C_{0,m}$), leitud (üldine) puhastumise kiiruskonstant (k_2), sisaldus kalas puhastumisetapi alguses ($C_{0,d}$) ja nende väärtuste hajuvus (tõus ja algordinaat);

— tabeli kujul esitatud andmed kalade lipiidisisalduse kohta (vajaduse korral kõrvutatuna aine sisaldusega asjaomases kalas) ning vastavad keskväärtused katserühma(de)s ja kontrollrühmas katse alguses, omastamisetapi lõpus ja puhastumisetapi lõpus;

— kõverad, mis hõlmavad kõiki mõõtmisandmeid ja väljendavad järgmisi näitajaid (vajaduse korral võib kontsentratsiooni väljendada kala terve keha või selle konkreetsete kudede massi alusel):

  — kasv, st kalade massi (ja pikkuse) muutus ajas või naturaallogaritmitud massiandmete muutus ajas;

([1]) Sööda analüüsimise meetod valgu-, lipiidi-, toorkiu- ja tuhasisalduse määramiseks; see teave saadakse tavaliselt sööda tarnija käest.

▼M7

— uuritavast ainest puhastumine kalades; ning

— naturaallogaritmitud kontsentratsiooniandmete muutus ajas puhastumisetapi vältel (sealhulgas leitud puhastumise kiiruskonstant k_2 ja aine naturaallogaritmitud eeldatav sisaldus kalas puhastumisetapi alguses – $C_{0,d}$);

— kui graafiku visuaalsel hindamisel täheldatakse selgelt võõrväärtuste esinemist, võib kahtlaste andmepunktide väljajätmiseks kasutada statistiliselt usaldusväärset võõrväärtuste testi ja esitada dokumenteeritud põhjenduse selliste andmepunktide väljajätmise kohta;

— arvutuslik kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant ja kasvu suhtes korrigeeritud poolväärtusaeg;

— arvutatud imendumistõhusus (α);

— toidukaudse biokuhjumise tegur korrigeerimata kujul, lipiidisisalduse ja kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeeritud kineetiline BMF (korrigeerimata ja lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud väärtus lähtuvalt terve kala märgmassist) ja vajaduse korral koespetsiifiline BMF;

— kõik andmed radioaktiivselt märgistatud aine metaboliitide ja nende akumuleerumise kohta;

— kõik katsega seotud ebatavalised asjaolud, kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja mis tahes muu asjakohane teave;

— allpool esitatud koondtabel asjakohaste mõõtmis- ja arvutustulemustega.

Ainest puhastumise kiiruskonstandid ja biokuhjumistegurid (BMF_K)	
k_g (kasvu kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV ([1]) nivool 95 %)
k_2 (üldine puhastumise kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV ([185]) nivool 95 %)
k_{2g} (kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV ([1]) nivool 95 %)
$C_{0,m}$ (mõõdetud sisaldus alghetkel – sisaldus kalas omastamisetapi lõpus; µg/g):	märkida väärtus ± SH ([2])
$C_{0,d}$ (eeldatav sisaldus puhastumisetapi alghetkel; µg/g):	märkida väärtus ± SH ([2])
I (kindlaksmääratud söödatarbimise kiirus sööda grammides grammi kala kohta päevas):	märkida väärtus
I_g (kasvu suhtes korrigeeritud tegelik söödatarbimise kiirus sööda grammides grammi kala kohta päevas):	märkida väärtus ± SH ([2])
$C_{sööt}$ (kemikaali kontsentratsioon söödas; µg/g):	märkida väärtus ± SH ([2])
α (aine imendumistõhusus):	märkida väärtus ± SH ([2])
BMF_K (kineetiline toidukaudse biokuhjumise tegur):	märkida väärtus (UV ([1]) nivool 95 %)
BMF_{Kg} (kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline toidukaudse biokuhjumise tegur):	märkida väärtus (UV ([1]) nivool 95 %)

▼M7

Ainest puhastumise kiiruskonstandid ja biokuhjumistegurid (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (kasvu suhtes korrigeeritud poolväärtusaeg päevades):	märkida väärtus ± SH ([2])
Lc (lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise tegur):	märkida väärtus
BMF_{KgL} (lipiidisisalduse ja kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline BMF):	märkida väärtus
BMF_{SSL} (hinnanguline lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud BMF statsionaarses olekus):	märkida väärtus ± SH ([2])

([1]) UV – usaldusvahemik (esitatakse juhul, kui seda on võimalik hinnata).
([2]) SH – standardhälve (esitatakse juhul, kui seda on võimalik hinnata).

KIRJANDUS

(1) Käesoleva lisa peatükk C.13 varem kehtinud kujul („Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse“).

(2) Käesoleva lisa peatükk A.6 „Lahustuvus vees“.

(3) Li, A., ja Doucette, W. J. (1993). The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 2031–2035.

(4) Käesoleva lisa peatükk A.8 „Jaotustegur“.

(5) Käesoleva lisa peatükk A.24 „Jaotuskoefitsient (*n*-oktanool/vesi): kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) meetod“.

(6) Käesoleva lisa peatükk A.23 „Jaotuskoefitsient (süsteemis 1-oktanool-vesi): aeglase segamise meetod“.

(7) Käesoleva lisa peatükk C.7 „Lagunemine – abiootiline lagunemine: hüdrolüüsi sõltuvus pHst“.

(8) OECD (1997). Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water (OCDE/GD(97)21). OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (OECD), Pariis, Prantsusmaa.

(9) Käesoleva lisa peatükk A.5 „Pindpinevus“.

(10) Käesoleva lisa peatükk A.4 „Aururõhk“.

(11) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine“.

(12) Käesoleva lisa peatükk C.29 „Kiire biolagundatavus – CO_2 suletud nõudes (vabaruumi katse)“.

(13) Connell, D. W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. T.* 102: 117–156.

(14) Bintein, S., Devillers, J., ja Karcher, W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29–39.

(15) OECD (2011). QSAR Toolbox 2.1. Veebruar 2011. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown, R. S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I. S., Villerius, L. A., ja Klamer, H. J. C. (2001). Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097–4102.

(17) Fernandez, J. D., Denny, J. S., ja Tietge, J. E. (1998). A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058–2062.

(18) Nichols, J. W., Fitzsimmons, P. N., Whiteman, F. W., ja Dawson, T. D. (2004). A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206–218.

(19) Parkerton, T. F., Arnot, J. A., Weisbrod, A. V., Russom, C., Hoke, R. A., Woodburn, K., Traas, T., Bonnell, M., Burkhard, L. P., ja Lampi, M. A. (2008). Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139–155.

(20) Verbruggen, E. M. J., Beek, M., Pijnenburg, J., ja Traas, T. P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436–2448.

(21) Schlechtriem, C., Fliedner, A., ja Schäfers, C. (2012). Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Env. Sci. Eur.* 24: 13.

(22) Käesoleva lisa peatükk C.47 „Varases arengujärgus kaladele avalduva mürgisuse katse“.

(23) Käesoleva lisa peatükk C.15 „Kala embrüo ja rebukotiga vastsetega tehtav lühiajaline toksilisuse katse“.

(24) Käesoleva lisa peatükk C.14 „Noorkalade kasvukatse“.

(25) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (ENV/JM/MONO(2000)6). OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (OECD), Pariis, Prantsusmaa.

(26) USA Keskkonnakaitseamet (1994). Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors (822-R-94-002). USA Keskkonnakaitseamet, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) USA Toidu- ja Ravimiamet (1999). Pesticide analytical manual (PAM). 1. kd. USA Toidu- ja Ravimiamet, Rockville, MD, USA.

(28) USA Toidu- ja Ravimiamet (1974). Jaotis 5, A (1) „Analysis of Human or Animal Adipose Tissue“. Väljaandes: Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples. Toim. Thompson, J. F. USA Toidu- ja Ravimiamet, Research Triangle Park, NC, USA.

(29) Bligh, E. G., ja Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37: 911–917.

(30) Gardner, W. S., Frez, W. A., Cichocki, E. A., ja Parrish, C. C. (1985). Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099–1105.

(31) Smedes, F. (1999) Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst* 124: 1711–1718.

(32) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application (ENV/JM/MONO(2006)18). OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 54. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (OECD), Pariis, Prantsusmaa.

▼M7

(33) Springer, T. A., Guiney, P. D., Krueger, H. O., ja Jaber, M. J. (2008). Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271–2280.

(34) Springer, T. A. (2009). Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot, J. A., Meylan, W., Tunkel, J., Howard, P. H., Mackay, D., Bonnell, M., ja Boethling, R. S. (2009). A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168–1177.

(36) Parkerton, T., Letinski, D., Febbo, E., Davi, R., Dzambia, C., Connelly, M., Christensen, K., ja Peterson, D. (2001). A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (ettekanne). SETAC Europe 12th Annual Meeting, Madrid, Hispaania.

(37) Fisk, A. T., Cymbalisty, C. D., Bergman, Ã., ja Muir, D. C. G. (1996). Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775–1782.

(38) Anonüümne autor (2004). Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol. Uute ja olemasolevate kemikaalide tehnilise komitee püsivate, bioakumuleeruvate ja toksiliste ainete töörühmale esitatud dokument.

(39) Anonüümne autor (2004). Background document to the fish dietary study protocol. Uute ja olemasolevate kemikaalide tehnilise komitee püsivate, bioakumuleeruvate ja toksiliste ainete töörühmale esitatud dokument.

(40) Bruggeman, W. A., Opperhuizen, A., Wijbenga, A., ja Hutzinger, O. (1984). Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish. *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173–189.

(41) Muir, D. C. G., Marshall, W. K., ja Webster, G. R. B. (1985). Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere* 14: 829–833.

(42) Thomann, R. V. (1989). Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699–707.

(43) Nichols, J. W., Fitzsimmons, P. N., ja Whiteman, F. W. (2004). A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219–229.

(44) Gobas, F. A. P. C., de Wolf, W., Burkhard, L. P., Verbruggen, E., ja Plotzke, K. (2009). Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624–637.

(45) Sijm, D. T. H. M., ja van der Linde, A. (1995). Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769–2777.

(46) Sijm, D. T. H. M., Verberne, M. E., de Jonge, W. J., Pärt, P., ja Opperhuizen, A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharm.* 131: 130–135.

(47) Fisk, A. T., Norstrom, R. J., Cymbalisty, C. D., ja Muir, D. G. G. (1998). Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951–961.

(48) McGrath, J. A., Parkerton, T. F., ja Di Toro, D. M. (2004). Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503–2517.

(49) Poppendieck, D. G. (2002). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Väitekiri. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty, L. S., ja Mackay, D. (1993). Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1718–1728.

(51) OECD (2012). Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results (ENV/JM/-MONO(2012)20). OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 175. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (OECD), Pariis, Prantsusmaa.

▼M7

1. liide

MÕISTED JA ÜHIKUD

Bioakumuleerumine – üldjuhul mõistetakse selle all protsessi, mille käigus aine sisaldus organismis saavutab taseme, mis on kõrgem kui hingamiskeskkonnas (nt vesi kala puhul või õhk imetaja puhul), toidus või nii ühes kui ka teises (1).

Biokontsentratsioonitegur (BCF või K_B) – käesoleva meetodi kohases akumuleerumiskatses omastamisetapi mis tahes ajahetkel kalas, kala pinnal või teatavates kalakudedes esineva uuritava aine kontsentratsiooni (C_f, mg/kg) ja ümbritsevas keskkonnas esineva uuritava aine kontsentratsiooni (C_w, mg/l) jagatis. BCFi väljendatakse liitrites kilogrammi kohta. Tuleb tähele panna, et kasvu ja/või standardse lipiidisisalduse suhtes korrigeerimist ei ole arvesse võetud.

Biokontsentratsioonitegur statsionaarses olekus (BCF_{SS}) – tegur, mille väärtus ei muutu pikema aja jooksul märkimisväärselt, kui uuritava aine kontsentratsioon ümbritsevas keskkonnas on asjaomase ajavahemiku vältel püsiv (vt statsionaarse oleku määratlus).

Biokontsentreerumine – uuritava aine kontsentratsiooni suurenemine organismis või selle pinnal (või selle teatavates kudedes) võrdluses uuritava aine kontsentratsiooniga ümbritsevas keskkonnas.

Biokuhjumine – uuritava aine kontsentratsiooni suurenemine organismis või selle pinnal (või selle teatavates kudedes) võrdluses uuritava aine kontsentratsiooniga toidus.

Biokuhjumistegur (BMF) – statsionaarses olekus täheldatav aine kontsentratsioon röövloomas võrdluses aine kontsentratsiooniga tema saakloomas (või toidus). Käesoleva katsemeetodi puhul hoidutakse hoolikalt veefaasi kaudu kokkupuute loomisest, mistõttu sel viisil leitud BMFi väärtus ei ole otseselt võrreldav väliuuringust saadud BMFi väärtusega (mille puhul kokkupuude võib üheaegselt toimuda nii vee kui ka toidu kaudu).

Imendumistõhusus (α) – soolestikust organismi imendunud aine suhtelise koguse näitaja (α on ühikuta suurus, kuid seda väljendatakse lihtosakaalu asemel sageli protsentuaalse osakaaluna).

Jaotuskoefitsient süsteemis oktanool/vesi (K_{OW}) – suhtarv, mis väljendab *n*-oktanoolis ja vees lahustunud aine tasakaalukontsentratsioonide suhet (katsemeetodid A.8 (2), A.24 (3) ja A.23 (4)); kasutatakse ka tähist P_{OW}. K_{OW} logaritmi kasutatakse aine veeorganismides biokontsentreerumise määra hindamiseks.

Kemikaal – aine või segu.

Kineetiline biokontsentratsioonitegur (BCF_K) – omastamise kiiruskonstandi k_1 ja puhastumise kiiruskonstandi k_2 suhtarv (st k_1/k_2; nimetatud mõisted on määratletud käesolevas liites). Üldiselt peaks selle näitaja väärtus olema võrreldav BCF_{SS}-i väärtusega (vt määratlust allpool), kuid kõrvalekaldeid võib esineda juhul, kui statsionaarse oleku saavutamises ei saa olla kindel või kui kineetilist BCFi on korrigeeritud kasvu suhtes.

Lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus (DOC) – katsekeskkonnas lahustunud orgaanilisest ainest pärit süsiniku sisaldust väljendav suurus.

Lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud biokontsentratsioonitegur statsionaarses olekus (BCF_{SSL}) – tegur, mis on normaliseeritud lähtuvalt kala lipiidisisaldusest 5 %.

Lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud, kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline biokontsentratsioonitegur (BCF_{KLg}) – tegur, mis on normaliseeritud lähtuvalt kala lipiidisisaldusest 5 % ja mida on korrigeeritud katse vältel toimunud kasvu suhtes, nagu on kirjeldatud 5. liites.

▼M7

Lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud kineetiline biokontsentratsioonitegur (BCF_{KL}) – tegur, mis on normaliseeritud lähtuvalt kala lipiidisisaldusest 5 %.

Mitut koostisosa sisaldav aine – aine, mis on REACH-määruse kontekstis määratletud ainena, mille rohkem kui ühe koostisosa osakaal on 10–80 massiprotsenti.

Omastamise kiiruskonstant (k_1) – arvväärtus, mis iseloomustab uuritava aine kontsentratsiooni suurenemise kiirust katsealuses kalas või kala pinnal (või teatavates kalakudedes) kala kokkupuutumisel selle ainega (k_1 väljendatakse liitrites kilogrammi kohta päevas).

Omastamisetapp või kokkupuuteetapp – aeg, mille jooksul kala puutub kokku uuritava ainega.

Orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC) – katsekeskkonna kõikidest orgaanilise aine allikatest, sealhulgas tahketest osakestest ja lahustunud orgaanilisest ainest pärit süsiniku sisaldust väljendav suurus.

Puhastumise (kao) kiiruskonstant (k_2) – arvväärtus, mis iseloomustab uuritava aine kontsentratsiooni vähenemise kiirust katsealuses kalas (või teatavates kalakudedes) pärast kala viimist uuritavat ainet sisaldavast keskkonnast seda ainet mittesisaldavasse keskkonda (k_2 väljendatakse päeva kohta).

Puhastumisetapp või kokkupuutejärgne (kao) etapp – aeg, mis järgneb katsealuse kala viimisele uuritavat ainet sisaldavast keskkonnast seda ainet mittesisaldavasse keskkonda ja mille jooksul uuritakse ainest puhastumist (või aine summaarset kadu) kalas (või teatavates kalakudedes).

Statsionaarne olek – olek, mis saavutatakse kalades sisalduva uuritava aine kontsentratsiooni (C_f) ajas muutumist väljendaval kõveral siis, kui kõver muutub ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevaste intervallidega võetud kolmes järjestikuses proovis mõõdetud C_f väärtused ei erine üksteisest rohkem kui ± 20 % ning esimese ja viimase järjestikuse analüüsi vahelisel perioodil ei täheldata C_f olulist suurenemist. Koondproovide analüüsimise puhul on vaja teha vähemalt neli järjestikust analüüsi. Aeglaselt omastatavate ainete puhul on sobivam intervall seitse päeva.

Söödatarbimise kiirus (I) – iga kala tarbitav keskmine päevane söödakogus terve kala eeldatava keskmise kehamassi ühiku kohta (väljendatakse sööda grammides grammi kala kohta päevas).

Tahke faasi abil mikroekstraheerimine – lahjade lahuste jaoks välja töötatud lahustivaba analüüsimeetod. Selle meetodi puhul viiakse polümeeriga kaetud kiud kokkupuutesse huvipakkuvat ainet sisaldava gaasifaasi või vedelfaasiga. Üldjuhul kohaldatakse kõnealuse analüüsi puhul miinimumaega, et võimaldada uuritaval ainel saavutada tasakaaluolek tahke ja voolava faasi vahel. Seejärel saab määrata huvipakkuva aine kontsentratsiooni määramismeetodist sõltuvalt kas otse kiul või pärast aine ekstraheerimist kiult lahustisse.

Tahketes osakestes esineva orgaanilise süsiniku sisaldus (POC) – katsekeskkonna orgaanilise hõljuvaine süsinikusisaldust väljendav suurus.

Toidukaudse biokuhjumise tegur – käesolevas katsemeetodis kasutatav mõiste, mille abil kirjeldatakse sellise toidukaudse kokkupuute katse tulemusi, kus hoidutakse hoolikalt veefaasi kaudu kokkupuute loomisest, mistõttu sel viisil leitud toidukaudse biokuhjumise teguri väärtus ei ole otseselt võrreldav väliuuringust saadud BMFi väärtusega (mille puhul kokkupuude võib üheaegselt toimuda nii vee kui ka toidu kaudu).

▼**M7**

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

KIRJANDUS

(1) Gobas, F. A. P. C., de Wolf, W., Burkhard, L. P., Verbruggen, E., ja Plotzke, K. (2009). Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624–637.

(2) Käesoleva lisa peatükk A.8 „Jaotustegur“.

(3) Käesoleva lisa peatükk A.24 „Jaotuskoefitsient (*n*-oktanool/vesi): kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) meetod“.

(4) Käesoleva lisa peatükk A.23 „Jaotuskoefitsient (süsteemis 1-oktanool-vesi): aeglase segamise meetod“.

▼M7

2. liide

MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED OMADUSED

Koostisosa	Piirsisaldus
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Kloorijäägid	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

▼M7

3. liide

KATSE JAOKS SOOVITATAVAD KALALIIGID

Soovitatav liik	Soovitatav katsetemperatuuride vahemik (°C)	Soovitatav katselooma üldpikkus (cm) [2]
Danio rerio [1] (*Teleostei*, *Cyprinidae*) (Hamilton-Buchanan) – vöödiline daanio	20–25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (*Teleostei*, *Cyprinidae*) (Rafinesque) – tüse tömpnina	20–25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (*Teleostei*, *Cyprinidae*) (Linnaeus) – harilik karpkala	20–25	8,0 ± 4,0 [3]
Oryzias latipes (*Teleostei*, *Poecilliidae*) (Temminck & Schlegel) – jaapani riisikala	20–25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (*Teleostei*, *Poecilliidae*) (Peters) – gupi	20–25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (*Teleostei*, *Centrarchidae*) (Rafinesque) – sinilõpuseline päikeseahven	20–25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (*Teleostei*, *Salmonidae*) (Walbaum) – vikerforell	13–17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (*Teleostei*, *Gasterosteidae*) (Linnaeus) – harilik ogalik	18–20	3,0 ± 1,0

[1] Meyer *et al.* (1).
[2] Tuleks silmas pidada, et katses kasutatakse suuruse näitajana ja kasvu kiiruskonstandi leidmiseks soovitatavalt massi. Samas mööndakse, et praktikas on hõlpsam kasutada pikkust, kui kalu tuleb katse alguses (st lähtepopulatsioonist) valida silma järgi.
[3] See pikkusevahemik on esitatud Jaapanis kehtival kemikaalide kontrollimise seadusel põhinevates katsemeetodites uute kemikaalide jmt jaoks.

Harvemini on kasutatud näiteks järgmisi suudmeala- ja merekalu.

Kotkaskalalane	(*Leiostomus xanthurus*)
Hammaskarp	(*Cyprinodon variegatus*)
Hõbeateriin	(*Menidia beryllina*)
Punnkõht	(*Cymatogaster aggregata*)
Inglise merikeel	(*Parophrys vetulus*)
Sarvikvõldas	(*Leptocottus armatus*)
Harilik ogalik	(*Gasterosteus aculeatus*)
Harilik huntahven	(*Dicentracus labrax*)
Harilik viidikas	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Eespool tabelis loetletud mageveekalu on lihtne kasvatada ja/või nad on aastaringselt laialdaselt kättesaadavad, ent suudmeala- ja mereliikide kättesaadavus on osaliselt piiratud konkreetsete riikidega. Nimetatud kalu saab kasvatada ja kultiveerida kalakasvanduses või laboris haiguste ja parasiitide suhtes kontrollitud tingimustes nii, et katseloomad on terved ja nende põlvnemine on teada. Need kalad on kättesaadavad paljudes maailma piirkondades.

KIRJANDUS

(1) Meyer, A., Biermann, C. H., ja Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* 252: 231–236.

▼M7

4. liide

VEEKAUDSE JA TOIDUKAUDSE KOKKUPUUTE KATSETES KASUTATAVAD PROOVIVÕTUKAVAD

1. **Teoreetiline näide proovivõtukavast täismahus tehtavas veekaudsel kokkupuutel biokontsentreerumise katses, milles uuritava aine log K_{OW} = 4.**

Võetav kalaproov	Proovivõtu ajakava		Veeproovide arv (1)	Kalade arv proovi kohta (1)
	Minimaalselt nõutavate proovide võtmise aeg (päevades) (2)	Lisaproovide võtmise aeg (päevades) (2)		
Omastamisetapp				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4–8 (5)
				(3 (6))
Puhastumisetapp				Kalad viiakse uuritavat ainet mittesisaldavasse vette
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4–8 (5)
		17,5		(4 + 3 (6))
KOKKU				40 –72 (48–80) (5)

(1) Sulgudes on esitatud lisaproovide võtmise korral analüüsitavate veeproovide või kalade arv.
(2) Katse eel arvutatud hinnanguline k_2 väärtus log K_{OW} väärtusel 4,0 on 0,652 päeva kohta. Katse kavandatud üldkestus on 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 päeva, s.o 14 päeva. Näitaja t_{SS}-i hindamist on käsitletud 5. liites.
(3) Veeproov võetakse pärast seda, kui vesi on vahetunud vähemalt kolmekordses kambri mahus.
(4) Need kalad võetakse lähtepopulatsioonist.
(5) Kui suurema täpsuse saavutamiseks või metabolismiuuringute tegemiseks on vaja suuremat arvu kalu, tuleks täiendavalt vajaminevad kalad võtta omastamisetapi ja puhastumisetapi lõpus (vt punkt 40).
(6) Lipiidisisalduse analüüsimiseks võib olla täiendavalt vaja vähemalt 3 kala, kui selleks ei ole võimalik kasutada kalu, kes valiti aine sisalduse määramiseks katse alguses, omastamisetapi lõpus ja puhastumisetapi lõpus. Tuleb silmas pidada, et paljudel juhtudel peaks olema võimalik kasutada selleks otstarbeks üksnes 3 kontrollrühmast võetud kala (vt punkt 56).

▼M7

2. **Teoreetiline näide proovivõtukavast aine toidukaudse bioakumuleerumise katses, kus omastamisetapi kestus on 10 päeva ja puhastumisetapi kestus 42 päeva.**

Võetav proov	Proovivõtu ajakava		Söödaproovide arv	Kalade arv proovi kohta	
	Etapi päev	Täiendav kalaproov?		Katserühm	Kontrollrühm
Omastamisetapp					
1	0	Võimalik (1) (2)	3 – katserühmast	0	5–10
			3 – kontrollrühmast (1)		(8–13) (2)
1A (3)	1–3			5–10	5–10
2	10	Jah (4)	3 – katserühmast	10–15 (4)	5–10
			3 – kontrollrühmast (1)	(13–18) (5)	8–13 (5)
Puhastumisetapp					
3	1	Jah (4)		10–15 (4)	5–10
4	2			5–10	5–10
5	4			5–10	5–10
6	7	Jah (4)		10–15 (4)	5–10
7	14			5–10	5–10
8	28			5–10	5–10
9	42	Jah (4)		10–15 (4) (13–18) (5)	5–10 (8–13) (5)
KOKKU				59–120 (63–126) (4) (5)	50–110 (56–116) (4) (5)

(1) Uuritava aine ja lipiidide sisalduse suhtes analüüsitakse nii kontrollrühmast kui ka katserühmast 3 söödaproovi.

(2) Kalaproov võetakse lähtepopulatsioonist uuringu algushetkele võimalikult lähedasel hetkel; lähtepopulatsioonist tuleks lipiidisisalduse suhtes analüüsimiseks võtta katse alguses vähemalt 3 kala.

(3) Omastamisetapi algusjärgus (soovi korral) võetavatest proovidest saadud andmed võimaldavad arvutada uuritava aine toidust imendumise määra, mida saab võrrelda puhastumisetapi andmete põhjal arvutatud imendumistõhususe väärtusega.

(4) Koespetsiifilise analüüsi jaoks võib võtta veel 5 kala.

(5) Lipiidisisalduse analüüsimiseks võib olla täiendavalt vaja vähemalt 3 kala, kui selleks ei ole võimalik kasutada kalu, kes valiti aine sisalduse määramiseks katse alguses, omastamisetapi lõpus ja puhastumisetapi lõpus. Tuleb silmas pidada, et paljudel juhtudel peaks olema võimalik kasutada selleks otstarbeks üksnes 3 kontrollrühmast võetud kala (vt punktid 56 ja 153).

Märkus etappide kestuse ja proovivõtuaegade kohta: omastamisetapp algab rikastatud sööda esmakordse andmise hetkel. Katsepäev kestab ühest söötmiskorrast kuni hetkeni veidi enne järgmist söötmiskorda 24 tundi hiljem. Esimene proov (tabelis tähistatud numbriga 1) tuleks võtta veidi (nt üks tund) enne esmakordset söötmist. Proovid tuleks kogu katse vältel ideaaljuhul võtta veidi enne järgmise päeva söötmiskorda (st umbes 23 tundi pärast proovivõtupäeva söötmiskorda). Omastamisetapp lõpeb veidi enne esmakordset rikastamata söödaga söötmist, mis tähistab puhastumisetapi algust (eeldatavalt jätkavad katserühma kalad 24 tunni jooksul pärast viimast rikastatud söödaga söötmist rikastatud sööda seedimist). Seepärast tuleks omastamisetapi lõpus võetav proov võtta veidi enne esmakordset rikastatud söödaga söötmist ja puhastumisetapi esimene proov umbes 23 tundi pärast esmakordset rikastatud söödaga söötmist.

▼M7

5. liide

ÜLDISED ARVUTUSED

1. Sissejuhatus

2. Omastamisetapi kestuse hindamine

3. Puhastumisetapi kestuse hindamine

4. Järjestikuse analüüsi meetod: puhastumise (kao) kiiruskonstandi k2 määramine

5. Järjestikuse analüüsi meetod: omastamise kiiruskonstandi k1 määramine (üksnes veekaudse kokkupuute meetodi puhul)

6. Omastamise ja puhastumise (kao) kiiruskonstantide üheaegse arvutamise meetod (üksnes veekaudse kokkupuute meetodi puhul)

7. Kineetilise BCF-i ja BMF-i korrigeerimine kasvust tingitud lahjenemise suhtes

8. Lipiidisisalduse suhtes normaliseerimine lähtuvalt lipiidisisaldusest 5 % (üksnes veekaudse kokkupuute meetodi puhul)

1. SISSEJUHATUS

Veekaudse kalades bioakumuleerumise üldmudel on kirjeldatav omastamise ja kaoga seotud protsesside kaudu; sealjuures ei võeta arvesse toidu kaudu omastamist. Diferentsiaalvõrrand (dC_f/dt), millega kirjeldatakse aine sisalduse muutumise kiirust kalas (mg/kg^{-1} päevas^{-1}), on järgmine (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[võrrand A5.1]},$$

kus

k_1 on aine kalas omastamist iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant (l/kg päevas),

k_2 on kalas toimuvat ainest puhastumist iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant (päeva kohta),

k_g on kala kasvu (kasvust tingitud lahjenemist) iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant (päeva kohta),

k_m on metaboliseerumist iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant (päeva kohta),

k_e on roojamist iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant (päeva kohta),

C_w on kontsentratsioon vees (mg/l) ja

C_f on kontsentratsioon kalas (mg/kg märgmassi alusel).

Bioakumuleeruvate ainete puhul võib eeldada, et kõige asjakohasem lubatud kõikumise (vt punkt 24) piiresse jääv kokkupuutekontsentratsioon vees (C_w) on ajaga kaalutud keskmine kontsentratsioon. Selle arvutamiseks vees soovitatakse järgida katsemeetodi C.20 (2) 6. liites sätestatud korda. Tuleks tähele panna, et vees täheldatava kontsentratsiooni naturaallogaritmimine on sobiv juhul, kui uuendamiste vahelisel perioodil toimub eeldatavalt kontsentratsiooni eksponentsiaalne vähenemine, näiteks poolstaatilise katserežiimi puhul. Läbivoolusüsteemi puhul ei pruugi kokkupuutekontsentratsiooni naturaallogaritmimine olla vajalik. Kui leitakse ajaga kaalutud keskmine kontsentratsioon vees, tuleks esitada see katseprotokollis ja kasutada seda järgnevates arvutustes.

Standardses kaladega tehtavas BCFi leidmise katses võib omastamist ja puhastumist kirjeldada kui kahte esimese järgu reaktsiooni kineetikat järgivat protsessi.

▼M7

Omastamiskiirus = $k_1 \times C_w$ [võrrand A5.2]

Üldine puhastumiskiirus = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [võrrand A5.3]

Statsionaarses olekus on omastamiskiirus eeldusel, et kasvu ja metabolismi mõju on tühine (st k_g ja k_m väärtust ei saa eristada nullist), võrdne puhastumiskiirusega ning seega tekib võrrandite A5.2 ja A5.3 kombineerimisel järgmine seos:

$$BCF = \frac{C_{f\ -SS}}{C_{w\ -SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [võrrand A5.4],

kus

$C_{f\text{-}SS}$ on kontsentratsioon kalas statsionaarses olekus (mg/kg märgmassi alusel) ja

$C_{w\text{-}SS}$ on kontsentratsioon vees statsionaarses olekus (mg/l).

Suhtarvu k_1/k_2 näol on tegemist kineetilise BCFga (BCF_K), mis peaks olema võrdne statsionaarset olekut iseloomustava BCFga (BCF_{SS}), mis väljendab kalades ja vees täheldatavate statsionaarsele olekule vastavate kontsentratsioonide suhet, kuid kõrvalekaldeid võib esineda juhul, kui statsionaarse oleku saavutamises ei saa olla kindel või kui kineetilist BCFi on korrigeeritud kasvu suhtes. Kuna k_1 ja k_2 on konstandid, ei ole statsionaarse oleku saavutamine BCF_K leidmiseks siiski vajalik.

Kirjeldatud esimest järku reaktsiooni võrranditest lähtuvalt on käesolevas 5. liites esitatud üldised arvutused, mida läheb vaja nii veekaudset kui ka toidukaudset kokkupuudet käsitlevate bioakumuleerumise hindamise meetodite puhul. Jaotised 5, 6 ja 8 on siiski asjakohased üksnes veekaudse kokkupuute meetodi puhul, kuid on lisatud siia põhjusel, et tegemist on üldkasutatavate meetoditega. Järjestikuse (jaotised 4 ja 5) ja üheaegse (jaotis 6) analüüsi meetodid võimaldavad arvutada omastamise ja puhastumise kiiruskonstandid, mida kasutatakse kineetilise BCFi leidmiseks. Järjestikuse analüüsi meetod k_2 määramiseks (jaotis 4) on oluline toidukaudse kokkupuute meetodi puhul, kuna saadud väärtust on vaja nii imendumistõhususe kui ka BMFi arvutamiseks. Üksnes toidukaudse kokkupuute meetodi puhul kasutatavaid arvutusi on üksikasjalikult käsitletud 7. liites.

2. OMASTAMISETAPI KESTUSE HINDAMINE

Enne katse tegemist saab k_2 ja seeläbi aega, mis kulub statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest teatava protsentuaalse osakaalu saavutamiseks, hinnata lähtuvalt empiirilisest seosest k_2 ja süsteemi *n*-oktanool/vesi iseloomustava jaotuskoefitsiendi (K_{OW}) vahel või k_2 ning k_1 ja BCFi vahel. Tuleks siiski meeles pidada, et käesolevas jaotises esitatud võrrandid kehtivad üksnes juhul, kui omastamine ja puhastumine toimuvad vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Kui see ei ole ilmselgelt nii, soovitatakse omastamisetapi kestuse hindamise vajaduse korral kasutada biostatistiku ja/või farmakokineetika spetsialisti abi.

Hinnangulist k_2 väärtust (päeva kohta) saab arvutada mitme meetodiga. Näiteks võib esmalt kasutada järgmisi empiirilisi seoseid ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); võrrand A5.5]

või

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [võrrand A5.6],

kus $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (ainete puhul, mille $K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); võrrand A5.7]

([1]) Nagu kõikide muudegi empiiriliste seoste puhul, tuleks enne veenduda, et asjaomane seos on kohaldatav ka uuritava aine puhul.

▼M7

ja $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot \log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90) [(5); võrrand A5.8];

W on uuritava ainega kokku puutuvate kalade keskmine mass (märgmassi grammides) omastamisetapi lõpus / puhastumisetapi alguses ([1]).

Muid seoseid on kirjeldatud viites 6. Konstandi k_2 hindamiseks võib olla kasulik rakendada keerukamat mudelit juhul, kui on näiteks tõenäoline, et aine metaboliseerumine on märkimisväärne (7, 8). Mudeli keerukuse suurenedes tuleks aga olla saadud hinnangute tõlgendamisel ettevaatlikum. Näiteks võib nitrorühmade esinemine viidata kiirele metaboliseerumisele, kuid see ei ole alati nii. Seepärast peaks hindamismeetodi kasutaja katse ajakava koostamisel kaaluma saadud tulemusi keemilise struktuuri ja kõikide muude asjakohaste andmete (näiteks eelkatsete tulemuste) valguses.

Statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest teatava protsentuaalse osakaalu saavutamiseks kuluva aja võib k_2 hinnangulise väärtuse põhjal leida omastamise ja puhastumise kineetikat (esimest järku reaktsiooni) kirjeldava üldvõrrandi abil, eeldusel, et kasvu ja metaboliseerumise määr on tühine. Kui katse jooksul täheldatakse märkimisväärset kasvu, ei ole allpool kirjeldatud hindamismeetodid usaldusväärsed. Sellisel juhul on parem kasutada kasvu suhtes korrigeeritud konstanti k_{2g}, nagu on kirjeldatud mujal (vt käesoleva liite jaotis 7).

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[võrrand A5.9]}$$

või püsiva C_w korral

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[võrrand A5.10]}$$

Statsionaarsele olekule lähenemisel ($t \rightarrow \infty$) võib võrrandi A5.10 taandada (vt viited 9 ja 10) kujule

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[võrrand A5.11]}$$

või

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[võrrand A5.12].}$$

Sellest lähtuvalt väljendab BCF × C_w ligikaudselt aine sisaldust kalas statsionaarses olekus ($C_{f\text{-}SS}$). [Märkus: sama lähenemisviisi võib kasutada statsionaarsele olekule vastava BMFi hindamiseks toidukaudse kokkupuute katse puhul. Sel juhul asendatakse BCF eespool esitatud võrrandites BMFga ja C_w aine sisaldusega söödas ($C_{sööt}$).]

Võrrandi A5.10 võib teisendada kujule

$$C_f = C_{f\ -SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[võrrand A5.13]}$$

või

$$\frac{C_f}{C_{f\ -SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[võrrand A5.14].}$$

Võrrandist A5.14 saab leida statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest teatava protsentuaalse osakaalu saavutamiseks kuluva hinnangulise aja, kui võrrandite A5.5 ja A5.6 põhjal on eelnevalt arvutatud k_2 hinnanguline väärtus.

Omastamisetapi statistiliselt optimaalne kestus statistiliselt vastuvõetavate andmete (BCF_K) saamiseks vastab üldiselt ajavahemikule, mille jooksul kõver, mis väljendab kalas sisalduva uuritava aine kontsentratsiooni logaritmi muutust lineaarsel skaalal esitatud ajas, saavutab väärtuse, mis on vähemalt

([1]) Kalade massi omastamisetapi lõpus saab hinnata lähtuvalt varasematest uuringuandmetest või teadmistest katseliigi kalade massi eeldatava suurenemise kohta omastamisetapi tüüpilise kestuse (nt 28 päeva) jooksul võrdluses kalade tavapärase massiga katse alguses.

▼M7

50 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest (st $0{,}69/k_2$), kuid mitte rohkem kui 95 % sellisest sisaldusest (st $3{,}0/k_2$) (11). Kui akumuleerumise määr ületab 95 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest, on võimalik arvutada BCF_{SS}.

Aeg, mille jooksul saavutatakse 80 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest, arvutatakse (lähtuvalt võrrandist A5.14) järgmiselt:

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[võrrand A5.15]}$$

ehk

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[võrrand A5.16].}$$

Samal viisil võib leida aja, mille jooksul saavutatakse 95 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest:

$$t_{95} = \frac{-ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[võrrand A5.17].}$$

Näiteks on omastamisetapi kestus (st aeg, mille jooksul saavutatakse teatav protsentuaalne osakaal statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest, nt t_{80} või t_{95}) sellise uuritava aine puhul, mille log K_{OW} = 4, järgmine (võrrandite A5.5, A5.16 ja A5.17 põhjal):

$$logk_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

k_2 = 0,652 \;päeva kohta

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45 \text{ päeva (59 tundi)}$$

või $t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60$ päeva (110 tundi.)

Teise võimalusena võib kasutada võrrandit:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31 \ (tundi) \qquad \text{[võrrand A5.18],}$$

et arvutada tegeliku statsionaarse oleku saavutamiseks vajalik aeg (t_{eSS}) (12). Uuritava aine puhul, mille log K_{OW} = 4, on see järgmine:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121 \ tundi.$$

3. PUHASTUMISETAPI KESTUSE HINDAMINE

Ajavahemikku, mille jooksul aine sisaldus organismis väheneb teatava protsendini algsisaldusest, võib samuti hinnata omastamist ja puhastumist kirjeldava üldvõrrandi abil (eeldusel, et tegemist on esimest järku reaktsiooni kineetikaga; vt võrrand A5.9) (1, 13).

Puhastumisetapi puhul eeldatakse, et C_w (toidukaudse kokkupuute katses $C_{sööt}$) väärtus on null. Kõnealuse võrrandi võib seega taandada kujule

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[võrrand A5.19]}$$

või

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[võrrand A5.20],}$$

kus $C_{f,0}$ on kontsentratsioon puhastumisperioodi alguses.

Sellest lähtuvalt arvutatakse 50 % ulatuses puhastumiseks kuluv aeg (t_{50}) järgmiselt:

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ehk

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Samamoodi leitakse 95 % ulatuses puhastumiseks kuluv aeg:

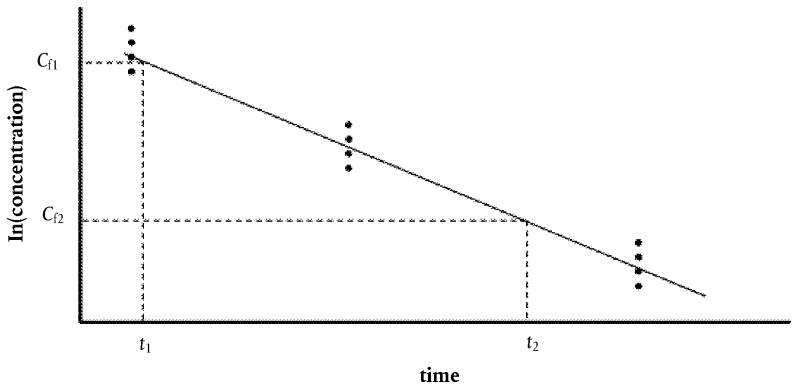
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Kui omastamisetapis soovitakse saavutada 80 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest (kestus $1{,}6/k_2$) ja puhastumisetapis kao määr 95 % (kestus $3{,}0/k_2$), siis on puhastumisetapp umbes kaks korda pikem kui omastamisetapp.

Tuleb meeles pidada, et kõnealuste hinnangute puhul lähtutakse eeldusest, et omastamine ja puhastumine toimuvad vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Need hinnangud ei kehti juhul, kui tegemist on selgelt muu kui esimest järku reaktsiooni kineetikaga.

4. JÄRJESTIKUSE ANALÜÜSI MEETOD: PUHASTUMISE (KAO) KIIRUSKONSTANDI K_2 MÄÄRAMINE

Enamiku biokontsentreerumise andmete puhul on eeldatud, et neid saab piisavalt hästi kirjeldada lihtsa kaheosalise/kaheparameetrilise mudeliga, mida väljendab sirgjoon, mis läheneb kalas puhastumisetapi ajal esineva kontsentratsiooni naturaallogaritmitud väärtustele.



Tuleb silmas pidada, et kõrvalekalded sirgjoonest võivad viidata esimest järku reaktsiooni kineetikast keerukamale puhastumiskineetikale. Kui puhastumine ei toimu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale, võib selle kirjeldamiseks kasutada graafikupõhist meetodit.

Konstant k_2 arvutatakse eri ajahetkedel võetud mitme proovi andmete põhjal lineaarse regressiooni teel, mis väljendab kontsentratsiooni naturaallogaritmi sõltuvust ajast. Regressioonisirge tõus vastab puhastumise kiiruskonstandi k_2 hinnangulisele väärtusele ([1]) Algordinaadi põhjal saab hõlpsalt leida keskmise kontsentratsiooni kalas puhastumisetapi alguses ($C_{0,d}$; see on võrdne keskmise kontsentratsiooniga kalas omastamisetapi lõpus) ning selle näitaja veamäära ([2]):

([1]) Enamiku programmide puhul, mis võimaldavad kasutada lineaarset regressiooni (nt andmeanalüüsi mooduliga Microsoft Excel), arvutatakse ka asjaomase hinnangulise väärtuse standardviga ja usaldusvahemik.

▼M7

$C_{0,\ d} = e^{algordinaat}$ [võrrand A5.21].

Kui on olemas ainult kahel eri ajahetkel võetud proovide andmed (näiteks minimeeritud katseplaani puhul), sisestatakse kõnealuse kahe kontsentratsiooni keskväärtused järgmisse võrrandisse:

$$k_2 = \frac{\ln\ (C_{fl})\ -\ \ln\ (C_{f2})}{t_{\ 2}\ -\ t_1}$$ [võrrand A5.22],

kus $\ln(C_{f1})$ ja $\ln(C_{f2})$ on vastavalt ajahetkel t_1 ja t_2 mõõdetud kontsentratsiooni naturaallogaritmid ning t_1 ja t_2 tähistavad ajavahemikku puhastumisetapi algusest kuni kõnealuse kahe proovi võtmiseni ([1]).

5. JÄRJESTIKUSE ANALÜÜSI MEETOD: OMASTAMISE KIIRUSKONSTANDI K_1 MÄÄRAMINE (ÜKSNES VEEKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI PUHUL)

Konstandi k_1 arvutamisel järjestikuste kontsentratsiooni ajas muutumist väljendavate omastamisetapi andmete alusel kasutatakse arvutiprogrammi järgmise mudeli lähendamiseks:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t})$$ [võrrand A5.23],

kus k_2 on teada varasematest arvutustest ning $C_f\ (t)$ ja $C_w\ (t)$ on vastavalt kalades ja vees ajahetkel t täheldatud kontsentratsioon.

Kui on olemas ainult kahel eri ajahetkel võetud proovide andmed (näiteks minimeeritud katseplaani puhul), kasutatakse k_1 leidmiseks järgmist võrrandit:

$$k_1 = \frac{C_{\ f}\ \cdot k_2}{C_w(1\ -\ e^{-k_2 t})}$$ [võrrand A5.24],

kus k_2 on teada varasematest arvutustest, C_f on kontsentratsioon kalas puhastumisetapi alguses ja C_w on keskmine kontsentratsioon vees omastamisetapi ajal ([2]).

Mudeli sobivust andmetega saab visuaalselt hinnata, kui kanda tõusudega k_1 and k_2 sirged koos proovivõtupunktide andmetega graafikule. Kui selgub, et järjestikuse analüüsi meetodiga saadud hinnanguline k_1 väärtus on ebausaldusväärne, tuleks k_1 ja k_2 arvutamiseks kasutada üheaegse analüüsi meetodit. Seejärel tuleks uuesti visuaalselt kontrollida saadud tõusude sobivust graafikule kantud mõõtmistulemustega. Kui sobivus on endiselt väike, võib see viidata asjaolule, et tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikaga ja tuleks kasutada keerukamat mudelit.

6. OMASTAMISE JA PUHASTUMISE (KAO) KIIRUSKONSTANTIDE ÜHEAEGSE ARVUTAMISE MEETOD (ÜKSNES VEEKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI PUHUL)

Konstantide k_1 ja k_2 väärtuse arvutamisel järjestikuste kontsentratsiooni ajas muutumist väljendavate andmete alusel võib kasutada arvutiprogramme ja järgmist mudelit:

$$C_f = C_{\ w} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad (0 < t < t_c)$$ [võrrand A5.25];

$$C_f = C_{\ w} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{\ -k_2 (t\ -\ t_c)}\ - e^{\ -k_2 t}) \qquad (t > t_c)$$ [võrrand A5.26],

kus

t_c on aeg omastamisetapi lõpus.

See lähenemisviis võimaldab vahetult leida hinnangulise k_1 ja k_2 standardvea. Kui k_1/k_2 asendatakse võrrandis A5.25 või A5.26 BCFga (vt võrrand 5.4), saab leida ka BCFi standardvea ja usaldusvahemiku usaldusnivool 95 %. See on eriti kasulik juhul, kui võrreldakse eri hinnangulisi väärtusi, mis on saadud

([1]) Erinevalt lineaarse regressiooni meetodist ei võimalda see valem arvutada *k2* standardviga.

([2]) Erinevalt lineaarse regressiooni meetodist ei võimalda see valem tavaliselt arvutada hinnangulise *k1* standardviga ega usaldusvahemikku.

▼M7

teisendatud andmete põhjal. Mudeli lähendamisel võib kasutada sõltuva muutuja (kalades täheldatav kontsentratsioon) nii logaritmimata kui ka naturaallogaritmitud väärtusi ning hinnata leitud BCFi usaldusväärsust.

Kuna k_1 and k_2 üheaegse hindamise korral on need näitajad omavahel tugevalt korreleeritud, võib olla soovitatav arvutada esmalt k_2 üksnes puhastumisandmete põhjal (vt eespool); enamikul juhtudel saab k_2 hinnata puhastumiskõvera alusel suhteliselt suure täpsusega. Seejärel saab omastamisandmete põhjal arvutada k_1 mittelineaarse regressiooni teel ([1]). Järjestikuse lähendamise korral soovitatakse kasutada sama andmeteisendust.

Mudeli sobivust andmetega saab visuaalselt hinnata, kui kanda leitud tõusudega sirged koos proovivõtupunktide andmetega graafikule. Kui selgub, et selle meetodiga saadud hinnanguline k_1 väärtus on ebausaldusväärne, tuleks k_1 ja k_2 arvutamiseks kasutada üheaegse analüüsi meetodit. Seejärel tuleks uuesti visuaalselt kontrollida lähendatud mudeli sobivust graafikule kantud mõõtmistulemustega ning võrrelda omavahel eri tüüpi mudelitega saadud k_1, k_2 ja neil põhineva BCFi hinnangulisi väärtusi ja nende standardvigu ja/või usaldusvahemikke.

Kui sobivus on endiselt väike, võib see viidata asjaolule, et tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikaga ja tuleks kasutada keerukamat mudelit. Üks kõige sagedasem segav asjaolu on kalade kasv katse ajal.

7. KINEETILISE BCF-I JA BMF-I KORRIGEERIMINE KASVUST TINGITUD LAHJENEMISE SUHTES

Käesolevas jaotises kirjeldatakse katse ajal toimuva kalade kasvu (st kasvust tingitud lahjenemise) suhtes korrigeerimise standardmeetodit, mis on kohaldatav üksnes esimest järku reaktsiooni kineetika puhul. Kui on viiteid sellele, et tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikaga, soovitatakse kasutada kasvust tingitud lahjenemise asjakohasel viisil arvessevõtmiseks biostatistiku abi või rakendada allpool kirjeldatud massipõhist lähenemisviisi.

Mõnel juhul on käesolev meetod kasvust tingitud lahjenemise arvessevõtmiseks ebatäpne või ei ole kasutatav (näiteks ainete puhul, millest puhastumine on väga aeglane ja mille uurimiseks kasutatakse kiire kasvuga kalu, võib kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandi k_{2g} leitud väärtus olla väga väike; seega omandab selle arvutamiseks kasutatud kahe kiiruskonstandiga seotud viga kriitilise tähtsuse ja mõnel juhul võib hinnanguline k_g olla suurem kui k_2). Sellisel juhul võib kasutada alternatiivset lähenemisviisi (st massipõhist meetodit), mis on rakendatav ka juhul, kui kasv ei toimu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale, ja mille puhul korrigeerimine ei ole vajalik. Seda lähenemisviisi on tutvustatud käesoleva jaotise lõpus.

Kasvu suhtes korrigeerimine kasvu kiiruskonstandi mahalahutamisel põhineva meetodiga

Käesoleva standardmeetodi puhul naturaallogaritmitakse iga kala massi- ja pikkuse andmed ning massi või selle pöördväärtuse naturaallogaritm kantakse graafikule, mis väljendab kasvu sõltuvust ajast (päevades); katserühma(de) ja kontrollrühma andmeid käsitletakse eraldi. Omastamis- ja puhastumisetapi andmeid töödeldakse eraldi samal viisil. Üldjuhul on kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeerimisel asjakohasem kasutada kasvu kiiruskonstandi (k_g) leidmiseks kogu katse vältel kogutud massiandmeid, kuid statistiliselt

([1]) Tuleks tähele panna, et hinnangulise*k2* usaldusväärsust ei kasutata bioakumuleerumise mudelis õigel viisil, kui seda näitajat vaadeldakse järjestikuse lähendamise meetodi kohasel *k1* lähendamisel konstantsena. Sellest tulenevalt on BCFi usaldusväärsus üheaegse ja järjestikuse lähendamise mudeli puhul erinev.

▼M7

olulised erinevused omastamisetappi ja puhastumisetappi iseloomustavate kasvu kiiruskonstantide vahel võivad viidata sellele, et tuleks kasutada puhastumisetapi kohta leitud kiiruskonstanti. Kokkupuutest tuleneva võimaliku mõju tuvastamiseks saab võrrelda veekaudse kokkupuute katses täheldatud üldist kasvukiirust katserühma(de)s ja kontrollrühmas.

Igas rühmas (katserühm(ad) ja kontrollrühm) arvutatakse vähimruutude meetodil iga üksiku kala andmetest, mitte päevastest keskväärtustest lähtuvalt standardsete statistikameetodite abil kalade massi (ja massi pöördväärtuse) naturaallogaritmi ja aja (päevades) lineaarne korrelatsioon nii kogu katse vältel kui ka omastamisetapis ja puhastumisetapis. Arvutatakse saadud sirgete tõusu iseloomustavate väärtuste hajuvus ja hinnatakse selle kaudu Studenti *t*-testi (või mitme kontsentratsiooni kasutamisel dispersioonanalüüsi) abil tõusude (kasvu kiiruskonstantide) erinevuse statistilist olulisust (p = 0,05). Üldjuhul kasutatakse kasvu suhtes korrigeerimiseks eelistatavalt massiandmeid. Samal viisil töödeldud andmetest pikkuse kohta võib olla kasu kontrollrühma ja katserühma(de) võrdlemisel kokkupuutest tuleneva mõju suhtes. Kui massiandmete analüüsi käigus ei täheldata statistiliselt olulisi erinevusi, võib katserühma(de) ja kontrollrühma andmed ühte koondada ning arvutada üldisele lineaarsele korrelatsioonile vastava sirge tõusu näol kalade kasvu üldise kiiruskonstandi katses tervikuna (k_g). Statistiliselt oluliste erinevuste ilmnemisel esitatakse kasvu kiiruskonstandi väärtus eraldi iga kalade rühma ja/või katseetapi kohta. Sel juhul tuleks igas rühmas leitud kiiruskonstanti kasutada asjaomase konkreetse rühma andmete korrigeerimiseks kasvust tingitud lahjenemise suhtes. Kui täheldatakse statistiliselt olulisi erinevusi omastamis- ja puhastumisetapi kiiruskonstantide vahel, tuleks kasutada puhastumisetapi andmete põhjal leitud kiiruskonstanti.

Arvutatud kasvu kiiruskonstandi (k_g, väljendatud päeva kohta) saab üldisest puhastumise kiiruskonstandist (k_2) maha lahutada, et saada puhastumise kiiruskonstant k_{2g}.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[võrrand A5.27]}$$

Omastamise kiiruskonstandi jagamisel kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandiga saadakse kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline BCF, mille tähis on BCF_{Kg} (või leitakse BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[võrrand A5.28]}$$

Kasvu suhtes korrigeeritud teguri BMF_{Kg} leidmiseks kasutatakse toidukaudse kokkupuute katses saadud kasvu kiiruskonstanti võrrandis A7.5 (vt 7. liide).

Kasvu suhtes korrigeerimine massipõhise meetodiga

Eespool kirjeldatud kasvu kiiruskonstandi mahalahutamise meetodi asemel võib kasutada järgmist alternatiivset meetodit, mille puhul kasvu suhtes korrigeerimine ei ole vajalik. See meetod tugineb puhastumisandmete massipõhisele kasutamisele lähtuvalt terve kala massist, mitte kontsentratsioonist.

Puhastumisetapis täheldatud kontsentratsioon kudedes (uuritava aine mass kala massiühiku kohta) teisendatakse uuritava aine massiks kala kohta: kontsentratsioon igas kalas viiakse tabelis (nt arvutipõhises tabelis) kokku asjaomase kala massiga ja iga kontsentratsioon korrutatakse vastava terve kala massiga, et saada uuritava aine mass kala kohta kõikides puhastumisetapi proovides.

Aine massi naturaallogaritmitud väärtused kantakse tavapärasel viisil graafikule katse (puhastumisetapi) kulgu väljendava aja funktsioonina.

▼M7

Veekaudse kokkupuute meetodi puhul leitakse omastamise kiiruskonstant tavapärasel viisil (vt jaotised 4 ja 6; tuleb tähele panna, et k_1 arvutamisel tuleks kõvera lähendamise võrrandites kasutada „tavapärast“ k_2 väärtust) ja puhastumise kiiruskonstant eespool kirjeldatud andmete põhjal. Kuna saadud puhastumise kiiruskonstant põhineb aine massil terve kala kohta ega sõltu seega kasvust, tuleks selle tähisena kasutada k_2 asemel k_{2g}-d.

8. LIPIIDISISALDUSE SUHTES NORMALISEERIMINE LÄHTUVALT LIPIIDISISALDUSEST 5 % (ÜKSNES VEEKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI PUHUL)

Veekaudse kokkupuute katsest leitud kineetilise ja statsionaarset olekut iseloomustava BCFi väärtus tuleks lisaks esitada lähtuvalt standardsest kala lipiidisisaldusest 5 % märgmassist, välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et uuritav aine akumuleerub peamiselt mujal kui rasvas (näiteks võib mõni perfluoritud aine seonduda valkudega). Kalades esinev kontsentratsioon või BCF tuleb ümber arvutada lähtuvalt lipiidisisaldusest 5 % märgmassist. Kui igas proovivõtupunktis on nii uuritava aine kui ka lipiidide sisalduse mõõtmiseks kasutatud sama kala, tuleb iga mõõdetud kontsentratsiooni korrigeerida asjaomase konkreetse kala lipiidisisalduse suhtes.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[võrrand A5.29]},$$

kus

$C_{f,L}$ on lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud kontsentratsioon kalas (mg/kg märgmassi alusel),

L on lipiidide osakaal (märgmassi alusel) ja

C_f on uuritava aine kontsentratsioon kalas (mg/kg märgmassi alusel).

Kui lipiidisisaldust ei ole määratud kõikidel proovivõtmiseks valitud kaladel, kasutatakse BCFi normaliseerimiseks keskmist lipiidisisaldust. Statsionaarsele olekule vastava BCFi puhul tuleks kasutada omastamisetapi lõpus uuritava ainega rühmas saadud tulemuste keskväärtust. Kineetilise BCFi normaliseerimise puhul on mõnel juhul õigustatud teistsuguse lähenemisviisi kasutamine, näiteks olukorras, kus lipiidisisaldus on omastamis- või puhastumisetapi jooksul märkimisväärselt muutunud. Samas tuleks siiski alati kasutada söötmisrežiimi, millega hoitakse ära lipiidisisalduse muutumine suurel määral.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[võrrand A5.30]},$$

kus

BCF_{KL} on lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud kineetiline BCF (l/kg),

L_n on lipiidide keskmine osakaal (märgmassi alusel) ja

BCF_K on kineetiline BCF (l/kg).

KIRJANDUS

(1) Arnot, J. A., ja Gobas, F. A. P. C. (2004). A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.

(2) Käesoleva lisa peatükk C.20 „Hiidkiivriku (*Daphnia magna*) sigivuse katse“.

(3) Spacie, A., ja Hamelink, J. L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309–320.

▼**M7**

(4) Sijm, D. T. H. M., Verberne M. E., de Jonge, W. J., Pärt, P., ja Opperhuizen, A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharm.* 131: 130–135.

(5) Bintein, S., Devillers, J., ja Karcher, W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29–39.

(6) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Taani Veekvaliteedi Instituut, Hørsholm, Taani.

(7) Arnot, J. A., Meylan, W., Tunkel, J., Howard, P. H., Mackay, D., Bonnell, M., ja Boethling, R. S. (2009). A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168–1177.

(8) OECD (2011). QSAR Toolbox 2.1. Veebruar 2011. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson, D. R., Blau, G. E., Alexander, H. C., ja Neely, W. B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785–792.

(10) Ernst, W. (1985). Accumulation in aquatic organisms. Väljaandes: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Sheeman, P., *et al*. (toim.), John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA, lk 243–255.

(11) Reilly, P. M., Bajramovic, R., Blau, G. E., Branson, D. R., ja Sauerhoff, M. W. (1977). Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614–622.

(12) Hawker, D. W., ja Connell, D. W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Water Res.* 22: 701–707.

(13) Konemann, H., ja van Leeuwen, K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere* 9: 3–19.

▼M7

6. liide

VEEKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI VÕRRANDITE OSA: MINIMEERITUD KATSEPLAAN

Siin kirjeldatud lähenemisviisi puhul on lähtutud põhimõttest, et biokontsentratsiooniteguri võib täismahus katse tulemuste põhjal leida kas biokontsentratsioonitegurina statsionaarses olekus (BCF_{SS}), mis väljendab kalakudedes esineva uuritava aine kontsentratsiooni ja vees esineva uuritava aine kontsentratsiooni suhet, või kineetilise biokontsentratsioonitegurina (BCF_K), mis väljendab omastamise kiiruskonstandi k_1 ja puhastumise kiiruskonstandi k_2 suhet. BCF_K on kehtiv ka olukorras, kus omastamisetapis ei saavutata aine sisalduse puhul statsionaarset olekut, eeldusel, et omastamine ja puhastumine toimuvad ligikaudu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale.

Kui aine sisaldust kudedes (C_{f1}) mõõdetakse kokkupuute lõpus (t_1) ja uuesti (C_{f2}) pärast teatava ajavahemiku möödumist (t_2), võib puhastumise kiiruskonstandi (k_2) hindamiseks kasutada 5. liites esitatud võrrandit A5.22.

Omastamise kiiruskonstandi k_1 võib seejärel algebraliste tehete abil arvutada 5. liites esitatud võrrandist A5.23 (kus C_f on võrdne C_{f1}-ga ja t on võrdne t_1-ga) (1). Minimeeritud katseplaani alusel saadud kineetiline biokontsentratsioonitegur (selle tähis on BCF_{Km}, et eristada seda mõne muu meetodi kohaselt leitud kineetilisest biokontsentratsioonitegurist) on seega:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[võrrand A6.1].}$$

Kontsentratsiooniandmeid või saadud tulemusi tuleks korrigeerida kasvust tingitud lahjenemise suhtes ja normaliseerida need lähtuvalt kala lipiidisisaldusest 5 %, nagu on kirjeldatud 5. liites.

Minimeeritud katseplaani alusel saadud BCF_{SS} on BCF, mis on arvutatud omastamisetapi lõpus lähtuvalt eeldusest, et on saavutatud statsionaarne olek. Viimast on võimalik üksnes eeldada, sest proovivõtupunktide arv ei ole selle tõendamiseks piisav.

$$\text{Minimeeritud katseplaani kohane} BCF_{SS} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}} \qquad \text{[võrrand A6.2],}$$

kus

$C_{f\text{-}minSS}$ on kontsentratsioon kalas omastamisetapi lõpus eeldatavalt saavutatud statsionaarses olekus (mg/kg märgmassi alusel) ja

$C_{w\text{-}minSS}$ on kontsentratsioon vees omastamisetapi lõpus eeldatavalt saavutatud statsionaarses olekus (mg/l).

KIRJANDUS

(1) Springer, T. A., Guiney, P. D., Krueger, H. O., ja Jaber, M. J. (2008). Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271–2280.

▼M7

7. liide

TOIDUKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI VÕRRANDITE OSA

1. Näide sobiva kaubandusliku kalasööda koostisosade sisalduse kohta

2. Sööda rikastamise meetodite näited

3. Imendumistõhususe ja biokuhjumisteguri arvutamine

4. Lipiidisisalduse suhtes korrigeerimine

5. Alghetke iseloomustava mõõdetud sisalduse (C0,m) ja eeldatava sisalduse (C0,d) vahelise erinevuse hindamine

6. Juhised uuritavate ainete kohta, millest puhastumine on väga kiire

1. NÄIDE SOBIVA KAUBANDUSLIKU KALASÖÖDA KOOSTISOSADE SISALDUSE KOHTA

Peamine koostisosa	Sisaldus kalajahus
Toorvalk	≤ 55,0 %
Toorrasv	≤ 15,0 % ([1])
Toorkiud	≥ 2,0 %
Niiskus	≥ 12 %
Tuhk	≥ 8 %

([1]) Mõnes piirkonnas võib kättesaadav olla üksnes selline kalasööt, mille lipiidisisaldus on esitatud ülemmäärast oluliselt väiksem. Sellisel juhul tuleks uuringus kasutada kättesaadavat väiksema lipiidisisaldusega sööta ja kohandada söötmisrežiimi, et tagada kalade püsimine tervena. Sööda lipiidisisaldust ei tohiks õli lisamisega kunstlikult suurendada.

2. SÖÖDA RIKASTAMISE MEETODITE NÄITED

Üldnõuded

Kontrollrühma sööt tuleks valmistada täpselt samal viisil kui rikastatud sööt, kuid ilma uuritava aineta.

Töödeldud söödas aine sisalduse kontrollimiseks tuleks rikastatud söödast võtta sobiva meetodiga kolm paralleelproovi ja mõõta saadud proovides uuritava aine sisaldus või radioaktiivsus. Tuleks tõendada, et analüütilise tuvastamise tõhusus on suur (> 85 %) ja proovidevaheline varieeruvus väike (aine sisaldus katse alguses võetud kolmes proovis ei tohiks keskväärtuse suhtes varieeruda rohkem kui ± 15 %).

Toidukaudse kokkupuute katses tuleks uuritava aine sisalduse määramiseks söödas võtta kolm söödaproovi katse nullpäeval ja omastamisetapi lõpus.

Kalasööda valmistamine puhta vedela uuritava ainega

Määratakse kindlaks soovitud nominaalne katsekontsentratsioon töödeldud kalasöödas, näiteks 500 µg uuritavat ainet grammi sööda kohta. Sobiv kogus (molaarmassi või eriradioaktiivsuse alusel) puhast uuritavat ainet lisatakse klaaspurgis või pöördaurusti kolvis teadaolevale kogusele kalasöödale. Kalasööda kogusest peaks jätkuma omastamisetapi lõpuni (tuleb võtta arvesse

▼M7

ka vajadust suurendada söödakogust igal söötmiskorral, tulenevalt kalade kasvamisest). Uuritavat ainet ja kalasööta tuleks omavahel aeglase pööritamise teel öö läbi segada (näiteks pöörleva segisti abil või pöördaurusti kolvis). Rikastatud sööta tuleks kuni kasutamiseni säilitada tingimustes, milles uuritav aine on söödaga segatuna püsiv (nt jahutatult).

Kalasööda valmistamine kandeainena kasutatava maisi- või kalaõliga

Tahke uuritav aine tuleks uhmris peeneks pulbriks hõõruda. Vedela uuritava aine võib lisada otse maisi- või kalaõlile. Uuritav aine lahustatakse teadaolevas koguses (nt 5–15 ml) maisi- või kalaõlis. Ainet sisaldav õli viiakse kadudeta sobiva suurusega pöördaurusti kolbi. Õlile aine lisamiseks kasutatud kolbi tuleks loputada kahe väikese alikvoodi õliga ja lisada need pöördaurusti kolbi, et tagada kogu lahustunud uuritava aine ülekandmine. Aine täieliku õlis lahustumise/dispergeerumise tagamiseks (või juhul, kui katses kasutatakse mitut uuritavat ainet) lisatakse kolbi mikrosegisti, kolb suletakse korgiga ja segu segatakse öö läbi suurel kiirusel. Kolbi lisatakse katse jaoks sobiv kogus kalasööta (tavaliselt graanulite kujul) ja kolvi sisu ühtlaseks segamiseks pööratakse kolbi pidevalt vähemalt 30 minutit, kuid soovitatavalt öö läbi. Seejärel säilitatakse rikastatud sööta sobivates tingimustes (nt jahutatult), et tagada uuritava aine püsivus söödas kuni selle kasutamiseni.

Kalasööda valmistamine orgaanilise lahustiga

Sobiv kogus uuritavat ainet (molaarmassi või eriradioaktiivsuse alusel), millest piisab soovitud sisalduse saavutamiseks, lahustatakse sobivas orgaanilises lahustis (nt tsükloheksaan või atsetoon; 10–40 ml või ka suurem kogus, kui seda nõuab rikastatava sööda kogus). Üks alikvoot selles lahusest või kogu lahus (osakaupa lisatuna) segatakse katse jaoks piisava koguse kalasöödaga, et saavutada vajalik aine nominaalne sisaldus. Sööda segamiseks uuritava ainega võib kasutada roostevabast terasest segamisnõud, mis jäetakse koos äsja rikastatud kalasöödaga kaheks ööpäevaks laboratoorsesse tõmbekappi (sööta segatakse aeg-ajalt), et liigne lahusti saaks aurustuda, või pidevalt pöörlevat pöördaurusti kolbi. Liigse lahusti „ärapuhumiseks“ võib vajaduse korral kasutada õhu- või lämmastikujuga. Tuleks jälgida, et uuritav aine lahusti eemaldamise käigus ei kristalliseeruks. Rikastatud sööta tuleks kuni kasutamiseni säilitada tingimustes, milles uuritav aine on söödaga segatuna püsiv (nt jahutatult).

3. IMENDUMISTÕHUSUSE JA BIOKUHJUMISTEGURI ARVUTAMINE

Imendumistõhususe arvutamiseks tuleks esmalt leida puhastumisetapi proovides mõõdetud kontsentratsioonide keskväärtuste põhjal üldise puhastumise kiiruskonstandi hinnanguline väärtus vastavalt 5. liite jaotisele 4 (tuleks kasutada järjestikuse analüüsi meetodit, st standardset lineaarset regressiooni). Söödatarbimise kiiruskonstant I ja omastamisetapi kestus t on teadaolevad katseparameetrid. Söödas määratud uuritava aine keskmine sisaldus $C_{\text{sööt}}$ on katse käigus mõõdetav muutuja. Uuritava aine sisaldus kalas omastamisetapi lõpus ($C_{0,\text{d}}$) leitakse tavaliselt naturaallogaritmitud kontsentratsiooni ja puhastumisetapi kulgu päevades väljendava aja vahelist sõltuvust kirjeldava sirge algordinaadi põhjal.

Aine imendumistõhusus (uuritava aine absorbeerumine soolestikus; a) arvutatakse järgmiselt:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{sööt}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[võrrand A7.1],}$$

kus

$C_{0,d}$ on aine eeldatav sisaldus kalas puhastumisetapi alghetkel (mg/kg),

▼M7

k_2 on üldine (kasvu suhtes korrigeerimata) puhastumise kiiruskonstant (päeva kohta), mis on arvutatud vastavalt 5. liite jaotises 3 esitatud võrranditele,

I on söödatarbimise kiiruskonstant (sööda grammides grammi kala kohta päevas),

$C_{\text{sööt}}$ on aine sisaldus söödas (milligrammides sööda kilogrammi kohta) ja

t on söötmisperioodi kestus (päevades).

Imendumistõhususe a täpse väärtuse leidmiseks võib siiski olla vaja korrigeerida arvutustes kasutatavat söödatarbimise kiirust I kalade kasvu suhtes. Katses, kus kalade kasv omastamisetapis (mille vältel söödakogust ei muudeta, et pidada kinni kindlaksmääratud söötmismäärast) on märkimisväärne, muutub tegelik söödatarbimise kiirus omastamisetapi käigus väiksemaks kui kindlaksmääratud söötmismäär ning tegelik imendumistõhusus on sellest tulenevalt suurem. (Tuleb tähele panna, et BMFi arvutamise puhul ei ole see oluline, kuna võrrandite A7.1 ja A7.4 kombineerimisel taandub liige I välja.) Kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeeritud keskmise söödatarbimise kiiruse I_g võib leida mitmel viisil, kuid üks otsene ja range viis on kasutada teadaolevat kasvu kiiruskonstanti (k_g) katsealuste kalade massi hindamiseks omastamisetapi konkreetsel ajahetkel:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[võrrand A7.2]},$$

kus

$W_f(t)$ on kalade keskmine mass omastamisetapi t-ndal päeval ja

$W_{f,0}$ on kalade keskmine mass katse alguses.

Sel viisil saab hinnata kalade keskmist massi (vähemalt) viimasel kokkupuutepäeval ($W_{f,\text{omastamise-lõpp}}$). Kuna söötmismäär on määratud kindlaks $W_{f,0}$ alusel, saab kõnealuse kahe kehamassi väärtuse abil arvutada tegeliku söödatarbimise kiiruse igal omastamispäeval. Kasvu suhtes korrigeeritud keskmise söödatarbimise kiiruse I_g (sööda grammides grammi kala kohta päevas), mida kasutatakse omastamisetapis toimuva kiire kasvu puhul I asemel, saab seega arvutada järgmiselt:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,omastamise-lõpp}} \qquad \text{[võrrand A7.3]}.$$

Pärast imendumistõhususe leidmist saab arvutada BMFi; selleks korrutatakse imendumistõhusus söödatarbimise kiiruskonstandiga I (või I_g, kui α arvutamiseks on kasutatud seda konstanti) ning jagatakse saadud väärtus üldise puhastumise kiiruskonstandiga k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[võrrand A7.4]}.$$

Samal viisil tuleks arvutada ka kasvu suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur, mille puhul lähtutakse kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandist (see leitakse vastavalt 5. liite jaotisele 7). Kui α leidmiseks on kasutatud I_g-d, tuleks siingi kasutada I asemel seda konstanti:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[võrrand A7.5]},$$

kus

α on imendumistõhusus (uuritava aine absorbeerumine soolestikus),

k_2 on üldine (kasvu suhtes korrigeerimata) puhastumise kiiruskonstant (päeva kohta), mis on arvutatud vastavalt 5. liite jaotises 3 esitatud võrranditele,

▼M7

k_{2g} on kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant (päeva kohta) ja

I on söödatarbimise kiiruskonstant (sööda grammides grammi kala kohta päevas).

Kasvu suhtes korrigeeritud poolväärtusaeg ($t_{1/2}$) arvutatakse järgmiselt:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[võrrand A7.6].}$$

Aine toidust imendumise tõhusust saab hinnata ka aine jääkide määramisega omastamisetapi lineaarses osas (1.–3. omastamispäeval). Sel juhul leitakse aine imendumistõhusus (α) järgmiselt:

$$\alpha = \frac{C_f(t)}{I \times C_{sööt} \times t} \qquad \text{[võrrand A7.7],}$$

kus

$C_f\ (t)$ on uuritava aine kontsentratsioon kalas ajahetkel t (mg/kg märgmassi alusel).

4. LIPIIDISISALDUSE SUHTES KORRIGEERIMINE

Kui kõikides proovivõtupunktides on nii lipiidisisaldus kui ka kemikaali sisaldus määratud samal kalal, tuleks igas kalas mõõdetud aine sisaldust korrigeerida asjaomase kala lipiidisisalduse alusel ja kanda lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud naturaallogaritmitud kontsentratsiooniandmed graafikule päevades väljendatud puhastumisaja funktsioonina, et leida $C_{0,d}$ ja k_2. Seejärel saab arvutada imendumistõhususe (võrrand A7.1) lipiidisisalduse alusel; selleks kasutatakse näitaja $C_{sööt}$ puhul lipiidisisaldusest lähtuvat väärtust (st $C_{sööt}$ korrutatakse lipiidide keskmise osakaaluga söödas). Järgnevalt saab võrrandite A7.4 ja A7.5 abil otse arvutada lipiidisisalduse (ja kasvust tingitud lahjenemise) suhtes korrigeeritud BMFi.

Muul juhul leitakse lipiidide keskmine massiosa kalades ja söödas nii katserühmas kui ka kontrollrühmas (sööda ja kontrollrühma kalade puhul kasutatakse tavaliselt kokkupuute alguses ja lõpus saadud andmeid, katserühma kalade puhul aga üksnes kokkupuute lõpus saadud andmeid). Mõne katse vältel võib kalade lipiidisisaldus oluliselt suureneda; sel juhul on asjakohasem kasutada katsealuste kalade keskmist lipiidisisaldust, mis on arvutatud kokkupuute lõpus ja puhastumise lõpus mõõdetud väärtuste põhjal. Üldjuhul tuleks kummagi lipiidide osakaalu näitaja leidmiseks kasutada üksnes katserühma andmeid.

Lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise tegur (L_c) arvutatakse järgmiselt:

$$L_C = \frac{L_f}{L_{sööt}} \qquad \text{[võrrand A7.8],}$$

kus L_f ja $L_{sööt}$ on lipiidide keskmine osakaal vastavalt kalades ja söödas.

Lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise teguri abil leitakse lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[võrrand A7.9].}$$

5. ALGHETKE ISELOOMUSTAVA MÕÕDETUD SISALDUSE ($C_{0,M}$) JA EELDATAVA SISALDUSE ($C_{0,D}$) VAHELISE ERINEVUSE HINDAMINE

Alghetke iseloomustavat mõõdetud sisaldust ($C_{0,m}$) ja eeldatavat sisaldust ($C_{0,d}$) tuleks omavahel võrrelda. Nende näitajate suur omavaheline sarnasus viitab puhastumisparameetrite leidmiseks kasutatud esimest järku reaktsiooni mudeli sobivusele.

▼M7

Mõnes katses võidakse täheldada märkimisväärset erinevust alghetke iseloomustava eeldatava väärtuse $C_{0,d}$ ja mõõtmistulemuste keskväärtuse $C_{0,m}$ vahel (vt käesoleva katsemeetodi punkti 159 viimane alapunkt). Kui $C_{0,d}$ on väga palju väiksem kui $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), võib see erinevus viidata seedimata rikastatud sööda esinemisele soolestikus. Seda võib katseliselt kontrollida väljalõigatud seedekulgla eraldi analüüsimise teel, kui omastamisetapi lõpus on proovide jaoks võetud ja säilitatud täiendav arv terveid kalu. Vastasel juhul ning kui puhastumisetapi andmete lineaarse regressiooni puhul kasutatud statistiliselt usaldusväärsest võõrväärtuste testist nähtub, et puhastumisetapi esimeses proovis mõõdetud sisaldus on ekslikult suur, võib olla asjakohane viia lineaarne regressioon k_2 leidmiseks läbi ilma puhastumisetapi esimese kontsentratsioonipunktita. Kui sellise lineaarse regressiooni määramatus on oluliselt väiksem ja on selge, et puhastumiskineetika vastab ligikaudselt esimest järku reaktsiooni kineetikale, võib olla sobiv kasutada saadud $C_{0,d}$ ja k_2 väärtust imendumistõhususe arvutamiseks. Katseprotokollis tuleks esitada sellekohane ammendav põhjendus. Samuti on võimalik, et puhastumine ei toimu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Kui see on tõenäoline (st naturaallogaritmitud andmed näivad järgivat lineaarse regressiooni sirge asemel kõverjoont), on k_2 ja $C_{0,d}$ arvutuslik väärtus ilmselt vale ning tuleks kasutada biostatistiku abi.

Kui $C_{0,d}$ on väga palju suurem kui mõõdetud väärtus ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), võib see viidata sellele, et ainest puhastumine on väga kiire (st proovivõtupunktide andmete puhul toimub lähenemine analüüsimeetodi määramispiirile puhastumisetapi väga varases järgus; vt allpool jaotis 6), et puhastumiskineetika kaldub kõrvale esimest järku reaktsiooni kineetikast, et k_2 ja $C_{0,d}$ leidmiseks kasutatud lineaarne regressioon ei ole läbi viidud õigesti või et katse mõnes proovivõtupunktis esines sisalduse mõõtmisel probleeme. Sellisel juhul tuleks lineaarse regressiooni graafiku lähemal uurimisel kindlaks teha, kas mõni kontsentratsioonipunkt on määramispiiril või selle lähedal, kas esineb võõrväärtusi ja kas andmepunktid järgivad selgelt kõverjoont (see viitab muud kui esimest järku reaktsiooni kineetikale), ning tuua see katseprotokollis esile. Iga järgnevat hinnanguliste väärtuste täpsuse suurendamiseks uuesti läbi viidavat lineaarset regressiooni tuleks kirjeldada ja põhjendada. Kui täheldatakse olulist kõrvalekaldumist esimest järku reaktsiooni kineetikast, on k_2 ja $C_{0,d}$ arvutuslik väärtus ilmselt vale ning tuleks kasutada biostatistiku abi.

6. JUHISED UURITAVATE AINETE KOHTA, MILLEST PUHASTUMINE ON VÄGA KIIRE

Nagu on selgitatud käesoleva katsemeetodi punktis 129, võib mõnest ainest puhastumine olla nii kiire, et usaldusväärse k_2 ja alghetke iseloomustava kontsentratsiooni $C_{0,d}$ leidmine ei ole võimalik, kuna aine ei ole puhastumisetapi väga varases järgus võetud proovides (st alates puhastumisetapi teisest proovist) praktiliselt enam määratav (selle sisalduseks märgitakse määramispiir). Kõnealust olukorda täheldati käesoleva katsemeetodi kontrollimiseks tehtud laboritevahelises võrdlusuuringus benso[*a*]püreeni puhul ning see on dokumenteeritud meetodi valideerimisaruandes. Sellisel juhul ei ole lineaarne regressioon usaldusväärne ja selle abil saadav $C_{0,d}$ hinnanguline väärtus on ebareaalselt suur ning sellest tulenevalt on näilik imendumistõhusus palju suurem kui 1. Sellises olukorras on võimalik arvutada k_2 ja maksimaalse BMFi konservatiivne hinnanguline väärtus.

Konstandi k_2 väärtuse hindamiseks lineaarse regressiooni teel (lähtuvalt naturaallogaritmitud kontsentratsiooniandmete sõltuvusest ajast) kasutatakse puhastumisetapi neid andmepunkte, kus sisaldus oli mõõdetav, ja esimest sellist punkti, millest alates aine ei olnud enam määratav (selle sisalduseks loeti määramispiir). Sellisel juhul kasutatakse tõenäoliselt üksnes kahte (nt puhastumisetapi 1. ja 2. proovivõtupäeva) andmepunkti, mille alusel saab hinnata k_2 väärtust vastavalt 5. liites esitatud võrrandile A5.22. Leitud hinnangulist k_2 väärtust saab kasutada imendumistõhususe hindamiseks vastavalt võrrandile A7.1, kus $C_{0,d}$ väärtus asendatakse mõõdetud sisaldusega

▼**M7**

alghetkel ($C_{0,m}$), juhul kui hinnanguline $C_{0,d}$ on ilmselgelt palju suurem kui katses olnuks võimalik saavutada. Kui $C_{0,m}$ ei ole mõõdetav, tuleks kasutada määramispiiri kalakudedes. Kui mõnel juhul leitakse sellise arvutuse tulemusena, et $\alpha > 1$, loetakse imendumistõhususe väärtuseks 1 ehk halvimale olukorrale vastav väärtus.

Seejärel võib võrrandi A7.4 alusel arvutada BMF_K maksimaalse hinnangulise väärtuse, mille esitamisel tuleks kasutada tähist „palju väiksem kui“ (<<). Näiteks katse puhul, kus söötmismäär on 3 %, puhastumise poolväärtusaeg on lühem kui 3 päeva ja α väärtus on vastavalt halvimale olukorrale 1, on BMF_K tõenäoline väärtus väiksem kui umbes 0,13. Tulenevalt sellise hinnangulise näitaja otstarbest ja asjaolust, et kõnealune väärtus on oma olemuselt konservatiivne, ei ole vaja seda kasvust tingitud lahjenemise ega kalade ja sööda lipiidisisalduse suhtes korrigeerida.

▼M7

8. liide

LÄHENEMISVIISID BCF-DE EELDATAVA HINNANGULISE VÄÄRTUSE LEIDMISEKS TOIDUKAUDSE KOKKUPUUTE KATSEST SAADUD ANDMETE PÕHJAL

Käesolev katsemeetod hõlmab toidukaudse kokkupuute meetodit selliste ainete bioakumuleerumise uurimiseks, mille puhul ei saa praktikas kasutada veekaudse kokkupuute meetodit. Veekaudse kokkupuute meetodiga leitakse biokontsentratsioonitegur, toidukaudse kokkupuute meetodiga aga saadakse otseselt teavet söömisest tuleneva võimaliku biokuhjumise kohta. Paljudes kemikaalide ohutust käsitlevates süsteemides (näiteks riskihindamisel ja ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise süsteemis) nõutakse veekaudse biokontsentreerumise andmete esitamist. Seega on vaja leida toidukaudse kokkupuute katsest saadud andmete põhjal hinnanguline biokontsentratsioonitegur, mis on võrreldav veekaudse kokkupuute meetodi kohases katses leitud näitajaga ([1]). Käesolevas liites on vaadeldud lähenemisviise selle saavutamiseks; samal ajal ollakse teadlikud sellistele hinnangutele omastest puudustest.

Toidukaudses katses mõõdetakse ainest puhastumist, et leida puhastumise kiiruskonstant k_2. Kui olemasolevate andmete põhjal saab leida omastamise kiiruskonstandi, mis kirjeldab olukorda, kus kalad on puutunud uuritava ainega kokku vee kaudu, on võimalik arvutada hinnanguline kineetiline BCF.

Uuritava ainega vee kaudu kokkupuutumist iseloomustava omastamise kiiruskonstandi hinnanguline väärtus sõltub paljudest eeldustest, mis kõik mõjutavad kõnealuse hinnanguga seotud määramatust. Peale selle eeldatakse sellisel viisil BCFi hindamise puhul, et üldine puhastumiskiirus (mida muu hulgas mõjutavad sellised tegurid nagu jaotumine organismis ja konkreetsed puhastumisprotsessid) ei sõltu kokkupuutemeetodist, millega saavutatakse uuritava aine akumuleerumine organismis.

Kõnealuse hindamist võimaldava lähenemisviisi puhul vajalikud põhieeldused võib kokku võtta järgmiselt.

Toidukaudsele omastamisele järgnev puhastumine toimub asjaomase aine puhul samal viisil kui veekaudsele kokkupuutele järgnev puhastumine.

Omastamine veest toimub vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale.

Sõltuvalt omastamise hindamiseks kasutatavast meetodist:

— on omastamine korreleeritav ainult kalade massiga,

— on omastamine korreleeritav ainult aine jaotuskoefitsiendiga süsteemis oktanool/vesi,

— on omastamine korreleeritav nii kalade massi kui ka süsteemis oktanool/vesi täheldatavat aine jaotuskoefitsienti hõlmavate kombineeritud andmetega,

— on tegelikus veekaudse kokkupuute katses omastamist mõjutada võivate tegurite, näiteks aine biosaadavuse, seadmetele adsorbeerumise, molekuli suuruse

— jms mõju väike.

Kõige olulisem aga on eeldus, et omastamise hindamise meetodi väljatöötamiseks kasutatav andmebaas (õppeandmestik) on asjaomase aine suhtes representatiivne.

Mitmes avalikest allikatest kättesaadavas artiklis on kirjeldatud võrrandeid, mis väljendavad kalas lõpuste kaudu toimuva veest omastamise seost aine jaotuskoefitsiendiga süsteemis oktanool/vesi, kala massiga (1–4), mahuga ja/või lipiidisisaldusega, membraani läbimise / imendumise tõhususega (5, 6) või kala hingamismahuga minutis (7), või mille puhul kasutatakse aine lenduvusel/massibilansil põhinevat lähenemisviisi (8–10). Selliseid meetodeid on kõnealuses kontekstis

([1]) Looduslikus veekeskkonnas toimub kokkupuude väga hüdrofoobsete ainetega kõige suuremal määral tõenäoliselt toidu tarbimise kaudu, mistõttu hinnanguline BCF ei kajasta täielikult sellise aine võimaliku bioakumuleerumise määra.

▼M7

üksikasjalikult hinnanud Crookes ja Brooke (11). Selles kontekstis sisaldab kasulikku teavet ka toidu kaudu omastamisest tuleneva bioakumuleerumise modelleerimist käsitlev Barberi artikkel (12), kuna see hõlmab ka lõpuste kaudu omastamise kiirust käsitlevatest mudelitest tulenevaid täiendusi. Nimetatud aspektile on keskendutud ka 2004. aasta toidukaudse kokkupuute katsemeetodi taustdokumendi (13) ühes osas.

Enamik kõnealustest mudelitest näivad olevat välja töötatud piiratud mahuga andmebaaside põhjal. Mudelite puhul, mille väljatöötamisel aluseks võetud andmebaaside kohta on olemas üksikasjalik teave, näib olevat kasutatud selliseid aineid, mis on sageli sarnase struktuuriga või kuuluvad sarnasesse funktsionaalrühma (nt kloororgaanilised ühendid). See suurendab katsespetsiifiliste tegurite, näiteks katseliigi, temperatuuri jms kõrval veelgi määramatust asjaomase mudeli kasutamisel kõnealustest ainetest erinevat liiki ainete omastamise kiiruskonstandi hindamiseks.

Olemasolevaid meetodeid käsitlevas ülevaates (11) on esile toodud, et ükski meetod ei ole „õigem“ kui mõni teine. Seepärast tuleks kasutatava mudeli valimist selgelt põhjendada. Kui on olemas mitu meetodit, mille kasutamist saab põhjendada, võib olla mõistlik esitada omastamise hindamise eri meetoditega saadud mitu k_1 (ja sellest tulenevalt BCFi) hinnangulist väärtust või k_1 (ja BCFi) väärtuste vahemik. Eri tüüpi mudelite ja nende väljatöötamiseks kasutatud andmestike vahelistest erinevustest tulenevalt ei ole eri viisil saadud hindamistulemuste keskväärtuse arvutamine siiski kohane.

Mõni teadlane on seisukohal, et selliseid hinnangulisi BCFi väärtusi on vaja korrigeerida biosaadavuse suhtes, et võtta arvesse aine adsorbeerumist lahustunud orgaanilisele süsinikule veekaudse kokkupuute tingimustes ning viia sellega asjaomane hinnanguline väärtus vastavusse veekaudse kokkupuute katsete tulemustega (nt viited 13 ja 14). Selline korrigeerimine ei pruugi aga olla asjakohane, kui võtta arvesse, et veekaudse kokkupuute katses halvimale olukorrale vastava (st aine biosaadava ja lahuses mõõdetud fraktsiooni suhet kajastava) hinnangulise väärtuse saamiseks vajalik lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus on väike. Väga hüdrofoobsete ainete puhul võib lõpuste kaudu omastamist piirata passiivse difusiooni kiirus lõpusepinna lähedal; sellisel juhul on võimalik, et kõnealuse korrigeerimisega kajastatakse seda mõju, mitte olukorda, mille jaoks nimetatud korrigeerimine on ette nähtud.

Soovitatakse keskenduda meetoditele, mille sisendandmed on siin kirjeldatud toidukaudse kokkupuute meetodi kohaselt uuritavate ainete puhul hõlpsalt kättesaadavad (st log K_{OW}, kalade mass). Võib kasutada muid meetodeid, mis nõuavad keerukamaid sisendandmeid, kuid selleks võib olla vaja teha katses lisamõõtmisi või hankida uuritava aine või asjaomase kalaliigi kohta üksikasjalikku teavet, mis ei pruugi olla laialdaselt kättesaadav. Peale selle võib mudeli valimist mõjutada mudeli valideerituse tase ja kasutusvaldkond (eri meetodite võrdlev ülevaade on esitatud viites 11).

Tuleks meeles pidada, et saadud hinnanguline k_1 ja BCFi väärtus on ebatäpsed ning aine bioakumuleerumise määrast ülevaate saamiseks võib olla vaja vaadelda neid tõendite kaalukusel põhineva lähenemisviisi raames koos leitud BMFi ja ainet iseloomustavate parameetritega (nt molekuli suurus). Kõnealuste parameetrite tõlgendamine ja kasutamine võib sõltuda asjaomasest õigusraamistikust.

KIRJANDUS

(1) Sijm, D. T. H. M., Pärt, P., ja Opperhuizen, A. (1993). The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1–14.

(2) Sijm, D. T. H. M., Verberne, M. E., Pärt, P., ja Opperhuizen, A. (1994). Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325–341.

(3) Sijm, D. T. H. M., Verberne, M. E., de Jonge, W. J., Pärt P., ja Opperhuizen, A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharm.* 131: 130–135.

▼M7

(4) Barber, M. C. (2003). A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963–1992.

(5) Opperhuizen, A. (1986). Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish. Väljaandes: Aquatic Toxicology and Environmental Fate. STP 921, Poston, T. M., ja Purdy, R. (toim.), USA Materjalide Katsetamise Ühing, Philadelphia, PA, USA, lk 304–315.

(6) Arnot, J. A., ja Gobas, F. A. P. C. (2004). A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.

(7) Thomann, R. V. (1989). Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699–707.

(8) Hendriks, A. J., van der Linde, A., Cornelissen, G., ja Sijm, D. T. H. M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399–1420.

(9) Campfens, J., ja Mackay, D. (1997). Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577–583.

(10) Arnot, J. A., ja Gobas, F. A. P. C. (2003). A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337–345.

(11) Crookes, M., ja Brooke, D. (2010). Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Aruande kavand. Environment Agency, Bristol, UK.

(12) Barber, M. C. (2008). Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755–777.

(13) Anonüümne autor (2004). Background document to the fish dietary study protocol. Uute ja olemasolevate kemikaalide tehnilise komitee püsivate, bioakumuleeruvate ja toksiliste ainete töörühmale esitatud dokument.

(14) Gobas, F., ja Morrison, H. (2000). Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. Väljaandes: Handbook of property estimation methods for chemicals. Boethling, R. S., ja Mackay, D. (toim.), Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA, lk 189–231.

▼B

C.14. **NOORKALADE KASVUKATSE**

1. **MEETOD**

Käesolev kasvu toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 215 (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva katse eesmärk on hinnata kemikaalidega pikaajalise kokkupuute mõju noorkalade kasvule. See põhineb meetodil, mis töötati välja ja mida on võrreldud laboritevaheliselt (1, 2) Euroopa Liidu piires, et hinnata kemikaalide mõju noorte vikerforellide *(Oncorynchus mykiss)* kasvule läbivoolutingimustes. Võib kasutada ka teisi hästi dokumenteeritud liike. Näiteks on saadud kogemusi sebrakala *(Danio rerio)* (3, 4) ja jaapani riisikalaga *(Oryzias latipes)* (5, 6, 7) tehtud kasvukatsetest.

Vt ka üldise sissejuhatuse C osa.

1.2. MÕISTED

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, vähim toimet avaldav kontsentratsioon) – madalaim uuritud uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse võrreldes kontrolliga aine märgatavat mõju ($p < 0,05$). Siiski peavad kõik uuritavad kontsentratsioonid, mis on suuremad kui LOEC, omama kahjulikku mõju, mis on võrdne või suurem kui LOEC korral täheldatud mõju.

NOEC (No Observed Effect Concentration – katsealustele organismidele täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) – uuritav kontsentratsioon, mille väärtus jääb vahetult alla LOEC väärtuse.

EC_x – käesolevas katsemeetodis uuritava aine kontsentratsioon, mis põhjustab x % muutuse kala kasvukiiruses võrreldes kontrollkatsetega.

Laadimisnorm – kalade märgmass vee ruumala kohta.

Loomkoormus – kalade arv vee ruumala kohta.

Üksikute kalade kasvu erikiirus – väljendab ühe üksiku kala kasvukiirust selle esialgse kaalu alusel.

Kasvu keskmistatud erikiirus mahutis – väljendab mahutis oleva populatsiooni keskmist kasvukiirust ühe kontsentratsiooni piires.

Kasvu pseudoerikiirus – väljendab individuaalset kasvukiirust võrrelduna mahutis oleva populatsiooni keskmise esialgse kaaluga.

▼B

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Eksponentsiaalses kasvufaasis olevad noorkalad kaalutakse ja asetatakse katsekambritesse, kus nad eelistatult läbivoolutingimustes või, kui see ei ole võimalik, siis sobivates poolstaatilistes (staatiline – uuendamine) tingimustes puutuvad kokku vees lahustatud uuritava aine paljude subletaalsete kontsentratsioonidega. Katse kestab 28 päeva. Kalu toidetakse iga päev. Toiduratsioon põhineb kalade esialgsel kaalul ja selle võib ümber arvutada pärast 14. päeva. Katse lõppedes kaalutakse kalad uuesti. Mõju kasvukiirusele analüüsitakse regressioonimudeli abil eesmärgiga määrata kindlaks kontsentratsioon, mis põhjustaks kasvukiiruses x % muutuse, st EC_X (nt EC_{10}, EC_{20} või EC_{30}). Alternatiivina võib neid andmeid võrrelda ka kontrollväärtustega, et määrata kindlaks vähim toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) ja seega ka täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC).

1.4. TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Akuutse toksilisuse katse tulemused (vt katsemeetod C.1), eelistatavalt samade liikide kohta, kes on valitud kõnealuse katse jaoks, peaksid olema kättesaadavad. See tähendab, et on teada uuritava aine lahustuvus vees ja aururõhk ja olemas on usaldusväärne analüütiline meetod aine kvantifitseerimiseks uuritavates lahustes teadaoleva ja dokumenteeritud täpsusega ja olemas on avastamispiir.

Kasulik teave on sealhulgas struktuurivalem, aine puhtus, püsivus vees ja valguse käes, pK_a, P_{ow} ja kiire biolagunduvuse katse tulemused (vt katsemeetod C.4).

1.5. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

— kontroll-looma(de) suremus ei tohi katse lõpus ületada 10 %;

— kalade keskmine kaal kontrollrühma(de)s peab olema piisavalt suurenenud, et võimaldada avastada kasvukiiruse juures oluliseks peetav minimaalne muutus. Laboritevaheline võrdlus (2) on näidanud, et vikerforelli puhul peab kalade keskmine kaal kontrollrühmades suurenema 28 päeva jooksul vähemalt poole võrra (st 50 %) nende esialgsest kaalust; nt esialgne kaal: 1 g/kala (= 100 %), lõplik pärast 28. päeva: ≥ 1,5 g/kala (≥ 150 %);

— lahustunud hapniku kontsentratsioon peab olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest (ASV) kogu katse jooksul;

— vee temperatuur ei tohi mis tahes ajal katse jooksul katsekambrites erineda rohkem kui ± 1 °C ja see tuleks säilitada 2 °C piires katsealusele liigile ettenähtud temperatuurivahemikus (1. liide).

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Seadmed**

Tavalised laboratooriumiseadmed, eeskätt järgmised:

— hapniku- ja pH-mõõturid;

▼B

— seadmed vee kareduse ja leelisuse kindlaksmääramiseks;

— asjakohased temperatuuri reguleerimise ja eelistatavalt pideva monitooringu seadmed;

— keemiliselt inertsest materjalist soovitatud laadimisnormi ja loomkoormuse jaoks piisava suurusega mahutid (vt punkti 1.8.5 ja 1. liidet);

— sobiva täpsusega kaalud (st täpsus kuni ± 0,5 %).

1.6.2. **Vesi**

Uuringus võib kasutada mis tahes sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema katseperioodi jooksul püsiva kvaliteediga. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, siiski ei tohiks see katse jooksul muutuda rohkem kui ± 0,5 pH-ühikut. Soovitatav vee karedus on üle 140 mg/l (väljendatuna $CaCO_3$-na). Et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi (nt moodustades uuritava aine kompleksi), tuleb vaheaegade järel võtta analüüsimiseks proove. Raskmetallid (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), enamik anioone ja katioone (nt Ca, Mg, Na, K, Cl ja SO_4), pestitsiidid (nt fosfororgaaniliste ja klooorgaaniliste pestitsiitide kogusisaldus), kogu orgaanilise süsiniku ja heljuva tahke aine sisaldus tuleks määrata näiteks iga kolme kuu järel, kui lahjendamiseks kasutatav vesi teatakse olevat suhteliselt püsiva kvaliteediga. Kui vähemalt ühe aasta jooksul on tõestatud püsiv vee kvaliteet, võib neid määramisi teha harvemini ja intervalle pikendada (nt iga kuue kuu järel). 2. liites on esitatud mõned lahjendamiseks kasutatava vee nõuetekohased keemilised omadused.

1.6.3. **Uuritavad lahused**

Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse ette põhilahust lahjendades.

Põhilahus tuleks eelistatavalt valmistada lihtsalt uuritava aine segamise või loksutamisega lahjendamiseks kasutatavas vees, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid (nt segamist või ultraheli). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne).

Lahustite või dispergantide (solubiliseerivate ainete) kasutamine võib sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks olla teatud juhtudel nõutav. Sobivad lahustid on näiteks atsetoon, etanool, metanool, dimetüülsulfoksiid, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergandid on näiteks Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metüültselluloos ja HCO-40. Kergesti biolagunduvate ainete (nt atsetoon) ja/või väga lenduvate ainete kasutamisel tuleb olla ettevaatlik, sest need võivad põhjustada probleeme bakterite kasvu tõttu läbivooluga katsetes. Solubiliseeriva aine kasutamisel ei tohi sellel olla märkimisväärset mõju kalade kasvule ega märgatavat negatiivset mõju noorkaladele, mida saab täheldada ainult lahustiga tehtava kontrollkatse abil.

▼B

Läbivooluga katsete puhul tuleb kasutada süsteemi, mis pidevalt jaotab ja lahjendab uuritava aine põhilahust (nt dosaatorpump, proportsionaallahjendusseade, küllastus seadmega süsteem), et viia katsekambritesse sisse erinevad kontsentratsioonid. Põhilahuste ja lahjendamiseks kasutatava vee voolukiirust tuleb kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev, ja need ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu uuringu jooksul. Laboritevaheline võrdlus (2) on näidanud, et vikerforelli puhul on aktsepteeritav vee eemaldumiskiirus katse jooksul 6 liitrit grammi kala kohta päevas (vt punkti 1.8.2.2).

Poolstaatiliste (uuendamis)katsete puhul sõltub keskkonna uuendamine uuritava aine püsivusest, kuid vett soovitatakse uuendada iga päev. Kui esialgsetes püsivuskatsetes (vt punkti 1.4) ei ole uuritava aine kontsentratsioon uuendamise perioodil stabiilne (st on väljaspool 80–120 % nimiväärtuse ulatust või langeb alla 80 % esialgselt määratud kontsentratsioonist), tuleks kaaluda läbivoolukatse kasutamist.

1.6.4. **Liigi valimine**

Käesoleva katse puhul soovitatakse kasutada vikerforelli (*Oncorhynchus mykiss*), kuna enamik kogemusi on saadud selle liigi laboritevahelise võrdluse kaudu (1, 2). Siiski võib kasutada ka teisi hästi dokumenteeritud liike, kuid katsemenetlust võib olla tarvis kohandada, et oleks tagatud sobivad katsetingimused. Näiteks on olemas kogemused ka sebrakala (*Danio rerio*) (3, 4) ja jaapani riisikalaga (*Oryzias latipes*) (5, 6, 7). Sellisel juhul tuleb liigi ja katsemeetodi valikut põhjendada.

1.6.5. **Kalade pidamine**

Katsealused kalad tuleb valida ühest populatsioonist, eelistatavalt samast pesakonnast, mida on hoitud vähemalt kaks nädalat enne katset sellistes veekvaliteedi ja valgustustingimustes, mis sarnanevad katses kasutatavatele. Kalade päevane toiduratsioon peaks moodustama vähemalt 2 % kehakaalust ja eelistatavalt 4 % kehakaalust päevas kogu pidamisperioodi ja katse jooksul.

Pärast 48tunnise kohanemisperioodi lõppu registreeritakse suremus ja kohaldatakse järgmisi kriteeriume:

— kui suremus on suurem kui 10 % populatsioonist seitsme päeva jooksul: lükatakse kogu partii kõrvale;

— kui suremus on populatsioonist 5–10 %: lastakse kaladel aklimatiseeruda veel seitse päeva; kui nende järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, lükatakse kogu partii kõrvale;

— kui suremus on seitsme päeva jooksul väiksem kui 5 % populatsioonist: võetakse partii vastu.

Kalad ei tohiks saada haiguste ravi kaks nädalat enne katset ega katse ajal.

▼B

1.7. KATSE KAVANDAMINE

„Katse kavandamine” on seotud uuritavate kontsentratsioonide arvu ja vahemike, iga kontsentratsioonitaseme jaoks mahutite arvu valiku ja kalade arvu valikuga mahuti kohta. Ideaaljuhul tuleks katse kavandada vastavalt

— uuringu eesmärkidele;

— kasutatava statistilise analüüsi meetodile;

— katsevahendite olemasolule ja maksumusele.

Eesmärkide aruanne peaks võimaluse korral määratlema statistilise võimsuse, millega antud erinevus (nt kasvukiiruses) tuleb tuvastada, või alternatiivina täpsus, millega tuleb määrata EC_X (nt x = 10, 20 või 30 ja eelistatavalt mitte alla 10). Ilma selleta ei ole võimalik uuringu suurust kindlalt määratleda.

Tähtis on mõista, et plaan, mis on optimaalne (võimaldab ressursse kõige paremini ära kasutada) ühte statistilise analüüsi meetodit kasutades, ei ole ilmtingimata optimaalne teise jaoks. Seega ei ole soovitatav plaan LOEC/NOEC kindlaksmääramiseks sama, mida soovitatakse regressioonanalüüsi korral.

Enamikul juhtudel eelistatakse regressioonanalüüsi dispersioonanalüüsile põhjustel, mida on käsitlenud Stephan ja Rogers (8). Siiski, kui ei ole leitud sobilikku regressioonimudelit ($r^2 < 0,9$), tuleks kasutada NOEC/LOEC.

1.7.1. **Regressioonanalüüsi kavandamine**

Regressioonalalüüsi kasutava katse kavandamisel tuleb silmas pidada järgmisi tähtsaid asjaolusid:

— toimiv kontsentratsioon (nt $EC_{10,\ 20,\ 30}$) ja see kontsentratsioonivahemik, mis pakub uuritava aine toime seisukohalt huvi, peaksid kindlasti olema kaetud katses kasutatavate kontsentratsioonidega. Täpsus, millega saab hinnata toimivaid kontsentratsioone, on suurim siis, kui toimiv kontsentratsioon paikneb kasutatud kontsentratsioonivahemiku keskel. Katse esialgse vahemiku leidmiseks võib olla kasulik katses kasutatavate sobivate kontsentratsioonide valimisel;

— selleks, et võimaldada rahuldavat statistilist modelleerimist, peaks katses kasutama vähemalt ühte kontrollmahutit ja viit erinevate kontsentratsioonidega lisamahutit. Solubiliseeriva aine kasutamisel tuleks lisaks katseseeriale kasutada ka ühte kontrollkatset, kus kasutatakse solubiliseerivat ainet kõige suuremas uuritud kontsentratsioonis (vt punkte 1.8.3 ja 1.8.4);

— kasutada võib sobilikku geomeetrilist või logaritmilist jada (9) (vt 3. liidet). Eelistada tuleb uuritavate kontsentratsioonide logaritmilist jaotust;

▼B

— kui kasutatakse rohkem kui kuut mahutit, tuleks lisamahuteid kasutada kas selleks, et võimaldada dubleerimist või jaotada need ära kontsentratsioonivahemike vahel, et võimaldada lähedasem vahemik tasemete vahel. Need mõlemad meetmed on võrdselt soovitatavad.

1.7.2. **Dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamine NOEC/LOEC määramise kavandamisel**

Eelistatavalt peaksid olema dubleerivad mahutid iga kontsentratsiooni jaoks ja statistiline analüüs tuleks teha mahuti tasandil (10). Ilma dubleerivate mahutiteta ei tohi lubada mahutite vahel mingit varieerivust peale selle, mis on põhjustatud üksikutest kaladest. Siiski, kogemus on näidanud (10), et mahutitevaheline varieerivus oli võrreldes mahutisisese (st kaladevahelise) varieerivusega uuritud juhtumi korral väga väike. Seetõttu on statistilise analüüsi tegemine üksikute kalade põhjal suhteliselt aktsepteeritavaks alternatiiviks.

Tavapäraselt kasutatakse katses vähemalt viit kontsentratsiooni geomeetrilises jadas, mille tegur eelistatavalt ei ületa 3,2.

Üldiselt, kui katsete tegemisel kasutatakse dubleerivaid mahuteid, peaks dubleerivate kontrollmahutite arv ja seega ka kalade arv olema kaks korda suurem iga uuritava kontsentratsiooni korral olevast arvust (12, 13, 14). Vastupidi, kui dubleerivaid mahuteid ei kasutata, peaks kontrollrühmas olevate kalade arv olema sama, mis iga uuritava kontsentratsiooni korral.

Kui ANOVA analüüs peab põhinema pigem mahutite kui üksikute kalade kohta käivatel andmetel (mis eeldaks kas iga kala märgistamist või kasvu pseudoerikiiruse kasutamist (vt punkti 2.1.2)), peab dubleerivaid mahuteid olema piisavalt, et oleks võimalik kindlaks määrata sama uuritava kontsentratsiooniga mahutite korral saadud tulemuste standardhälvet. See tähendab, et vigasid puudutav vabadusastme arv dispersioonanalüüsis peaks olema vähemalt 5 (10). Kui dubleeritakse ainult kontrollkatseid, on oht, et vea varieeruvus moondub, sest see võib suureneda koos kõnealuse kasvukiiruse keskväärtusega. Kuna kasvukiirus kontsentratsiooni suurenedes tõenäoliselt aeglustub, toob see endaga kaasa varieerivuse liiga suureks hindamise.

1.8. KATSE KÄIK

1.8.1. **Katsealuste kalade valik ja kaalumine**

Tähtis on minimeerida kalade kaalu varieerumine katse alguses. 1. liites esitatakse erinevate liikide sobivad suuruste vahemikud, mida soovitatakse käesolevas katses kasutada. Katses kasutatava terve kalapartii üksikute kalade kaal katse alguses peaks ideaaljuhul olema vahemikus ± 10 % aritmeetilisest keskmisest kaalust ja igal juhul ei tohiks see ületada 25 %. Soovitatav on varem kaaluda kalade näidispartii, et arvutada välja keskmine kaal.

▼B

Põhipopulatsiooni ei tohiks toita 24 tundi enne katse algust. Seejärel tuleks kalad valida välja juhuslikult. Kasutades üldanesteetikumi (nt 100 mg/l trikaiinmetaansulfonaati (MS 222) sisaldavat vesilahust, mis on neutraliseeritud kahe osa naatriumvesinikkarbonaadi lisamisega ühe osa MS 222 kohta), kaalutakse kalad üksikult märjalt (kuivaks pühituna) 1. liites toodud täpsusega. Kalad, kelle kaal on ettenähtud piirides, tuleks katsesse võtta ja jagada ära juhuslikult katseanumate vahel. Kalade kogu märgmass igas katsemahutis tuleks protokollida. Nii anesteetikumide kasutamine kui ka kalade käitlemine (sealhulgas kuivatamine ja kaalumine) võib põhjustada stressi ja vigastusi noorkaladele, eriti väiksema suurusega liikidele. Seetõttu tuleks noorkalu käidelda äärmise ettevaatlikkusega, et vältida katseloomadele stressi tekitamist ja nende vigastamist.

Kalad kaalutakse uuesti katse 28. päeval (vt punkti 1.8.6). Siiski, kui peetakse vajalikuks toiduratsioon ümber arvutada, võib kalu uuesti kaaluda ka katse 14. päeval (vt punkti 1.8.2.3). Kalade suuruse muutuste määramiseks võib kasutada ka teist meetodit, näiteks fotografeerimist, mille põhjal saab kohandada toiduratsioone.

1.8.2. **Kokkupuutetingimused**

1.8.2.1. *Kestus*

Katse kestus on ≥ 28 päeva.

1.8.2.2. *Laadimisnormid ja loomkoormused*

On oluline, et laadimisnorm ja loomkoormus sobiksid kasutatavale katseliigile (vt 1. liidet). Kui loomkoormus on liiga suur, põhjustab ülekoormus stressi, mis omakorda aeglustab kasvamise kiirust ja võib põhjustada haigestumist. Kui see on liiga väike, võib see põhjustada territoriaalset käitumist, mis omakorda võib mõjutada kasvu. Igal juhul peaks laadimisnorm olema piisavalt väike, et õhustamiseta säilitada lahustunud hapniku kontsentratsioon, mis moodustab vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadavast väärtusest. Laboritevaheline võrdlus (2) on näidanud, et vikerforelli puhul on aktsepteeritav laadimisnorm 16 forelli (kaaluga 3–5 g) 40 liitris. Soovitatav vee eemaldumiskiirus katse jooksul on 6 liitrit grammi kala kohta päevas.

1.8.2.3. *Söötmine*

Kalu tuleks sööta sobiva toiduga (1. liide) piisaval määral, et esile kutsuda aktsepteeritavat kasvukiirust. Hoolt tuleb kanda mikroobide kasvu vältimise ja vee hägustumise eest. Vikerforelli puhul vastab 4 %ne päevane kaaluiive tõenäoliselt nendele tingimustele (2, 15, 16, 17). Päevase ratsiooni võib jagada kaheks võrdseks portsjoniks ja anda kaladele kaks korda päevas, vähemalt viietunnise vahega. Ratsioon põhineb kalade esialgsel kogukaalul iga katseanuma kohta. Kui kalad kaalutakse uuesti 14. päeval, arvutatakse ratsioon ümber. Kalu ei tohiks toita 24 tundi enne kaalumist.

▼B

Söömata toit ja väljaheited tuleks eemaldada katseanumast iga päev, puhastades hoolikalt iga mahuti põhja imedes.

1.8.2.4. *Valgus ja temperatuur*

Fotoperiood ja veetemperatuur peaksid olema sobivad katseliigile (1. liide).

1.8.3. **Uuritavad kontsentratsioonid**

Tavaliselt nõutakse uuritava aine viit kontsentratsiooni hoolimata uuringu kavast (vt punkti 1.7.2). Eelnevad teadmised uuritava aine toksilisuse kohta (nt akuutsest katsest ja/või vahemiku määramise uuringutest) peaks aitama välja valida sobivad uuritavad kontsentratsioonid. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleb seda põhjendada. Kõige kõrgem uuritav kontsentratsioon ei tohiks ületada aine lahustuvuspiiri vees.

Kui põhilahuse valmistamisel kasutatakse solubiliseerivat ainet, ei tohiks selle lõplik kontsentratsioon olla suurem kui 0,1 ml/l ja see peaks eelistatavalt olema sama kõikides katseanumates (vt punkti 1.6.3). Siiski tuleks tarvitusele võtta kõik meetmed, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

1.8.4. **Kontrollimised**

Lahjendamiseks kasutatava vee kontrollimiste arv sõltub uuringu kavast (vt punkte 1.7–1.7.2). Kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, tuleks seda kontrollida sama arv kordi kui vett.

1.8.5. **Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus**

Katse jooksul määratakse uuritava aine kontsentratsioonid korrapäraste ajavahemike tagant (vt allpool).

Läbivoolukatsetes tuleb kontrollida lahusti ja mürkaine põhilahuse voolukiiruseid kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev, ja need ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu katse jooksul. Kui eeldatakse, et uuritava aine kontsentratsioonid on ± 20 % nimiväärtusest (st vahemikus 80–120 %; vt punkte 1.6.2 ja 1.6.3), soovitatakse analüüsida vähemalt kõige kõrgemaid ja madalamaid uuritavaid kontsentratsioone katse alguses ja seejärel nädalaste vaheaegadega. Katse puhul, milles ei eeldata, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest (uuritava aine püsivusandmete põhjal), on vajalik analüüsida kõiki uuritavaid kontsentratsioone, kuid järgides sama režiimi.

Poolstaatilistes (uuendamis)katsetes, kus eeldatakse, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest, soovitatakse analüüsida vähemalt kõige kõrgemaid ja madalamaid kontsentratsioone kohe pärast valmistamist ja vahetult enne uuendamist uuringu alguses ja seejärel iga nädal. Katsete puhul, milles ei eeldata, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest, tuleb analüüsida kõiki uuritavaid kontsentratsioone, järgides sama režiimi, mida kasutatakse püsivamate ainete puhul.

▼B

On soovitatav, et tulemused põhineksid mõõdetud kontsentratsioonidel. Siiski, kui on tõendeid selle kohta, et uuritava aine kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % nimiväärtusest või esialgsest mõõdetud kontsentratsioonist kogu katse jooksul, võivad tulemused põhineda nimi- või mõõdetud väärtustel.

Proove võib olla vaja filtreerida (nt kasutades 0,45 μm suuruseid poore) või tsentrifuugimist. Tsentrifuugimine on soovitatav menetlus. Siiski, kui uuritav aine ei adsorbeeru filtritel, on ka filtreerimine aktsepteeritud.

Katse jooksul tuleks mõõta lahustunud hapniku kontsentratsiooni, pH-d ja temperatuuri kõikides katseanumates. Kontrollkatsetes ja suurima kontsentratsiooniga anumas mõõdetakse vee kogukaredust, leelisust ja soolsust (kui see on oluline). Lahustunud hapniku kontsentratsiooni ja soolsust (kui see on oluline) tuleb mõõta minimaalselt kolm korda (katse alguses, keskel ja lõpus). Poolstaatiliste katsete puhul soovitatakse lahustunud hapniku kontsentratsiooni mõõta sagedamini, eelistatavalt enne ja pärast iga vee uuendamist või vähemalt kord nädalas. pH tuleks määrata staatilistes uuendamise katsetes iga vee uuendamise alguses ja lõpus ning vähemalt kord nädalas läbivooluga katsetes. Karedust ja leelisust tuleks mõõta üks kord iga katse ajal. Temperatuuri tuleks eelistatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katseanumas.

1.8.6. **Vaatlused**

Kaal: katse lõpus tuleb ära kaaluda kõik ellujäänud kalad märgmassi (kuivaks pühituna) saamiseks kas rühmana katseanuma kaupa või üksikult. Üksikute loomade kaalumisele, mis eeldab, et kõik kalad oleksid märgistatud, eelistatakse kaalumist katseanuma kaupa. Individuaalkaalu mõõtmise korral üksikute kalade kasvu erikiiruse kindlaksmääramiseks peaks olema valitud selline märgistamismeetod, mis väldiks loomadele stressi tekitamist (sobida võivad külmmärgistamise alternatiivid, nt peene värvilise õngenööri kasutamine).

Kalad tuleks katseperioodi jooksul üle vaadata iga päev ja mis tahes välised anomaaliad (nagu verejooks, värvimuutus) ja ebanormaalne käitumine kirja panna. Suremus tuleks registreerida ja surnud kalad eemaldada võimalikult kiiresti. Surnud kalu ei asendata, sest laadimisnorm ja loomkoormus on piisavad, et vältida mahutis olevate kalade arvu muutuse mõju kasvule. Siiski tuleb kohandada söödaratsiooni.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Katse kavandamisel ja analüüsimisel soovitatakse kaasata statistikut, kuna käesolev katsemeetod võimaldab märkimisväärset varieerumist eksperimentaalses plaanis, näiteks katsekambrite arvus, uuritavate kontsentratsioonide arvus, kalade arvus jne. Pidades silmas uuringu kavandamises olevaid võimalusi, ei ole siin antud konkreetseid juhiseid statistiliste menetluste kohta.

▼B

Kasvukiirusi ei tuleks arvutada välja nende katseanumate kohta, milles suremus ületab 10 %. Siiski tuleks suremuse määr registreerida kõikide uuritavate kontsentratsioonide kohta.

Mis meetodit ka ei kasutata andemete analüüsimisel, keskseks kontseptsiooniks on kasvu erikiirus r aegade t_1 ja t_2 vahel. Seda võib väljendada erinevalt, sõltuvalt sellest, kas kõik kalad on märgistatud või mitte, või kas on tarvis keskmist väärtust mahuti kohta.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kus

r_1 = üksikute kalade kasvu erikiirus

r_2 = keskmine kasvu erikiirus mahutis

r_3 = kasvu pseudoerikiirus

w_1, w_2 = ühe konkreetse kala kaal vastavalt ajahetkedel t_1 ja t_2

$\log_e w_1$ = logaritm üksiku kala kaalust uuringuperioodi alguses

$\log_e w_2$ = logaritm üksiku kala kaalust uuringuperioodi lõpus

$\log_e W_1$ = w_1 väärtuste logaritmide keskmine kalade kohta mahutis uuringuperioodi alguses

$\log_e W_2$ = w_2 väärtuste logaritmide keskmine kalade kohta mahutis uuringuperioodi lõpus

t_1, t_2 = aeg (päevades) uuringuperioodi alguses ja lõpus

r_1, r_2, r_3 võib välja arvutada perioodi 0–28 päeva kohta ja vajaduse korral (st kui on tehtud mõõtmised 14. päeval) ka perioodide 0–14 ja 14–28 päeva kohta.

2.1.1. **Regressioonanalüüsi tulemused (kontsentratsioon – vastuse modelleerimine)**

Käesolev analüüsimeetod sobib esitama sobivat matemaatilist sõltuvust kasvu erikiiruse ja kontsentratsiooni vahel ja seega võimaldab kindlaks määrata EC_X, st mis tahes nõutava EC väärtuse. Käesoleva meetodi kasutamisel ei ole r arvutamine üksiku kala jaoks (r_1) vajalik ja selle asemel võib analüüs põhineda keskmisel r väärtusel (r_2) mahuti kohta. Eelistatud on viimane meetod. See on samuti sobivam väiksemate liikide kasutamise korral.

Mahuti keskmised spetsiifilised kasvu kiirused (r_2) tuleks j joonestada graafiliselt kontsentratsiooniga suhestatuna, selleks et jälgida kontsentratsiooni-reaktsiooni suhet.

▼B

r_2 ja kontsentratsiooni vahelise sõltuvuse väljendamiseks tuleks valida sobiv mudel ja selle valikut tuleb toetada sobiva põhjendusega.

Kui ellujäänud kalade arv on erinevates mahutites erinev, peab mudeli sobitamisel kasutama kas lihtsaid või mittelineaarseid kaalutud mudeleid, mis võimaldavad kasutada erineva suurusega rühmasid.

Mudeli sobitamise meetod peab võimaldama hinnangu andmist näiteks EC_{20}-le ja selle dispersioonile (kas standardviga või usaldusvahemik). Graafik sobitatud mudeli kohta tuleks andmete suhtes esitada nii, et mudeli sobivus oleks ilmne (8, 18, 19, 20).

2.1.2. **Tulemuste analüüs LOEC kindlaksmääramiseks**

Kui katse sisaldab endas mahutite dubleerimist kõikidel kontsentratsioonitasanditel, peaks LOEC kindlaksmääramine põhinema mahutit iseloomustava keskmise kasvu erikiiruse (vt punkti 2.1) dispersioonanalüüsil (ANOVA), millele järgneb sobiv meetod (nt Dunnetti või Williamsi katse (12, 13, 14, 21) iga kontsentratsiooni keskmise r-väärtuse võrdlemiseks kontrollkatsete keskmise r-väärtusega eesmärgiga kindlaks määrata madalaim kontsentratsioon, mille jaoks see erinevus on oluline 0,05 tõenäosuse tasemel. Kui parameetriliste meetodite eeldatavad nõuded ei ole täidetud –normaaljaotusest erinev jaotus (nt Shapiro-Wilki katse) või heterogeenne dispersioon (Barletti katse) –, tuleks kaaluda andmete teisendamist homogeenseteks dispersioonideks enne ANOVA analüüsi või kaalutud ANOVA tegemist.

Kui katses ei dubleerita mahuteid igal kontsentratsioonitasemel, on mahutitel põhinev ANOVA vähetundlik või ei ole seda võimalik teha. Sellisel juhul oleks vastuvõetavaks kompromissiks võtta ANOVA aluseks üksikute kalade kasvu pseudoerikiirused r_3.

Iga uuritava kontsentratsiooni r_3 keskväärtust võib seejärel võrrelda kontrollkatsete r_3 keskväärtusega. Seejärel võib kindlaks määrata LOEC nii nagu varem. Tuleb tunnistada, et kõnealune meetod ei võimalda mingil moel võtta arvesse suuremat mahutitevahelist varieeruvust kui see, mis on põhjustatud üksikute kalade vahelisest varieeruvusest, ega taga kaitset selle eest. Siiski on kogemus näidanud (8), et mahutitevaheline varieerivus oli väga väike võrreldes mahutisisese (st kaladevahelise) varieerivusega. Kui analüüs ei hõlma üksikuid kalu, tuleb esitada võõrväärtuste identifitseerimise meetod ja õigustus selle kasutamiseks.

2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, kui uuritavates lahustes mõõdetud mürkaine kontsentratsioonid on analüütilise meetodi avastamispiiri lähedal või kui poolstaatilistes katsetes on uuritava aine kontsentratsioon enne uuendamist väiksem kui värskelt valmistatud lahuses.

2.3. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

▼B

2.3.1. **Uuritav aine:**

— füüsikaline loomus ning olulised füüsikalis-keemilised omadused;

— keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas puhtus ja uuritava aine kvantifitseerimiseks kasutatav analüütiline meetod (vajaduse korral).

2.3.2. **Katsealused liigid:**

— võimaluse korral teaduslik nimi;

— liin, suurus, tarnija, mis tahes eelnev ravi jms

2.3.3. **Katsetingimused:**

— kasutatav katsemenetlus (nt poolstaatiline/uuendav, läbivool, laadimine, loomkoormus jne);

— uuringu kava (nt katseanumate arv, uuritavad kontsentratsioonid ja dubleerivad anumad, kalade arv anuma kohta);

— põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, tuleb esitada ka selle kontsentratsioon);

— uuritavate kontsentratsioonide nimiväärtused, uuritavas anumas mõõdetud keskväärtused ja nende standardhälbed ja nende saamismeetod ning tõendid selle kohta, et need mõõtmised vastavad uuritava aine kontsentratsioonidele tegelikus lahuses;

— lahjendamiseks kasutatava vee omadused: pH, karedus, leelisus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloori jääktasemed (kui mõõdetakse), kogu orgaaniline süsinik, suspendeeritud tahked ained, katsekeskkonna soolsus (kui mõõdetakse) ja mis tahes muud tehtud mõõtmised;

— vee kvaliteet katseanumas: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;

— üksikasjalik teave söötmise kohta (nt toidu (toitude) liik, päritolu, antav kogus ja sagedus).

2.3.4. **Tulemused:**

— tõendid selle kohta, et kontrollkatsete korral kehtis valiidsuskriteerium, ning andmed mis tahes kontsentratsiooni korral esineva suremuse kohta;

— kasutatud statistilise analüüsi meetodid, dubleerimisel või kaladel põhinev statistika, andmete töötlemine ja kasutatud meetodite õigustus;

— andmetabelid üksikute ja keskmiste kalakaalude kohta 0-, 14. (kui mõõdeti) ja 28. päeval, keskmise kasvu erikiiruse kohta mahutis või kasvu pseudoerikiiruse väärtused (vastavalt olukorrale) perioodide 0–28 päeva või võimaluse korral 0–14 ja 14–28 kohta;

— statistilise analüüsi tulemused (st regressioonanalüüs või ANOVA) eelistatavalt tabelite ja graafikute kujul ning LOEC ($p = 0,05$) ja NOEC või EC_x võimaluse korral koos vastavate standardvigadega;

▼B

— kalade ebatavalised reaktsioonid ja nähtavad mõjud, mida on põhjustanud uuritav aine.

3. VIITED

1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

2) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp. 1855–1870.

4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (Brachydanio rerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp. 157–164.

5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

6) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp. 287–297.

7) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (Oryzias latipes). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328–338.

9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 pp.

10) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096–1121.

13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

▼B

14) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103–117.

15) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

16) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, pp. 33–41.

17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485–1494.

19) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510–531.

▼B

1. liide

KATSETEKS SOOVITATAVAD KALALIIGID JA SOBIVAD KATSETINGIMUSED

Liik	Soovitatav katse-temperatuuri vahemik (°C)	Fotoperiood (tundides)	Soovitatav vahemik kala algkaalu jaoks (g)	Nõutav mõõtmistäpsus	Laadimisnorm (g/l)	Loomkoormus (liitri kohta)	Sööt	Katse kestus (päevades)
Soovitatavad liigid:								
Oncorhynchus mykiss Vikerforell	12,5–16,0	12–16	1–5	lähima 100 mg-ni	1,2–2,0	4	Kaubanduslik lõhelaste kalamaimude kuivtoit	≥ 28
Teised hästi dokumenteeritud liigid:								
Danio rerio Sebrakala	21–25	12–16	0,050–0,100	lähima 1 mg-ni	0,2–1,0	5–10	Elustoit (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Jaapani riisikala	21–25	12–16	0,050–0,100	lähima 1 mg-ni	0,2–1,0	5–20	Elustoit (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼B

2. liide

MÕNED AKTSEPTEERITAVA LAHJENDAMISEKS KASUTATAVA VEE KEEMILISEDOMADUSED

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked ained (mikroosakestena)	< 20 mg/l
Kogu orgaaniline süsinik	< 2 mg/1
Ammoniaak (ioniseerimata)	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide kogusisaldus	< 50 ng/1
Orgaanilistes ühendites oleva kloori kogusisaldus	< 25 ng/1

▼B

3. liide

Toksilisuse uuringuks sobivate kontsentratsioonide logaritmilised jadad (9)

Veerg (kontsentratsioonide arv 100 ja 10 või 10 ja 1 vahel) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Veerust võib valida viiest (või enamast) järjestikusest kontsentratsioonist koosneva jada. Kontsentratsioonidevahelised keskpunktid veerus (x) leitakse veerus (2x + 1). Loetletud väärtused võivad esindada kontsentratsioone, mida väljendatakse protsendina mahu või massi kohta (mg/l või µg/l). Väärtusi võib vajaduse korral korrutada või jagada 10 mis tahes astmega. 1. veergu võiks kasutada juhul, kui määramatus toksilisuse taseme kohta on suur.

▼B

C.15. KALA EMBRÜO JA REBUKOTIGA VASTSETEGA TEHTAV LÜHIAJALINE TOKSILISUSE KATSE

1. MEETOD

Käesolev lühiajaline toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 212 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev lühiajaline toksilisuse katse kalaembrüote ja rebukotiga vastsetega on lühiajaline uuring, milles uuritava ainega kokkupuudet uuritakse alates värskelt viljastatud marjaterade arenguetapist kuni rebukotist väljatulekuetapi lõpuni. Embrüote ja rebukotiga vastsete katses ei toimu söötmist ja seega tuleks katse lõpetada ajal, kui rebukotiga vastsed toituvad veel rebukotist.

Katse eesmärk on kindlaks määrata kemikaalide letaalsed ja teatud ulatuses ka subletaalsed mõjud katses kasutatavate liikide konkreetsetes arenguetappides. Käesolevast katsest saadav teave oleks kasulik, kuna a) selle katse abil oleks võimalik ühendada letaalsed ja subletaalsed uuringud, b) seda võiks kasutada sõelkatsena kas täieliku varajaste eluetappide või kroonilise toksilisuse katsete jaoks ja c) sellega võiks uurida liike, mille kasvatamismeetodid ei ole piisavalt arenenud endogeensest toitumisest eksogeensele toitumisele ülemineku perioodi jaoks.

Tuleks pidada meeles, et kemikaalide kroonilist pikaajalist toksilist toimet kaladele saab tavaliselt täpselt hinnata ainult katsete alusel, mis hõlmavad kala kõiki elutsükleid, ja et mis tahes vähendatud ulatuses kokkupuude ainult teatud eluetappidel võib vähendada tundlikkust ja seega võib tuua kaasa kroonilise toksilisuse alahindamise. Seetõttu eeldatakse, et embrüote ja rebukotiga vastsete katse on vähem tundlik kui täiemahuline varajaste eluetappide katse, eriti mis puutub kõrge lipofiilsusega kemikaalidesse (log P_{ow} > 4) ja kemikaalidesse, millel on spetsiifiline toksiline toime. Siiski eeldatakse väiksemaid erinevusi tundlikkuses nende kahe katse vahel selliste kemikaalide puhul, millel on mittespetsiifiline narkootiline toime (1).

Enne käesoleva katse avalikustamist saadi enamik embrüote ja rebukotiga vastsete katse kogemusi magevees elava kalaga *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae* – üldnimetus sebrakala). Üksikasjalikumad juhised katse tegemiseks kõnealuse liigiga on seetõttu esitatud 1. liites. Siiski ei välista see ka teiste liikide kasutamist, mille kohta on olemas kogemusi (tabelid 1A ja 1B).

1.2. MÕISTED

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – vähim toimet avaldav kontsentratsioon) – kõige madalam testitud uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse aine märgatavat mõju ($p < 0,05$) võrreldes kontrolliga. Siiski peab kõikidel uuritavatel kontsentratsioonidel, mis on kõrgemad kui LOEC, olema kahjulik mõju, mis on võrdne või suurem kui LOECga täheldatud mõju.

NOEC (No Observed Effect Concentration – täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) – uuritav kontsentratsioon, mis on vahetult alla LOEC väärtust.

▼B

1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Embrüod ja rebukotiga vastsed viiakse kokku vees lahustatud uuritava aine erinevate kontsentratsioonidega. Uuringu võib vastavalt protokollile viia läbi kas poolstaatilisena või läbivoolu-uuringuna. Selle valik sõltub uuritava aine iseloomust. Katse algab viljastatud marjaterade asetamisega katsekambritesse ja lõpetatakse vahetult enne seda, kui mis tahes vastsete rebukott ükskõik millises katsekambris on täielikult imendunud või enne nälga suremise algust kontrollkatsetes. Letaalset ja subletaalset mõju hinnatakse ja võrreldakse kontrollväärtustega, et kindlaks määrata vähim toimet avaldav kontsentratsioon ja seega ka kontsentratsioon, mille puhul toimet ei täheldata. Alternatiivina võib neid analüüsida regressioonimudeli abil, et kindlaks määrata kontsentratsioon, mis põhjustaks teatud protsentuaalse toime (nt LC/EC_x, kus x on määratletud protsentuaalne toime).

1.4. TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Akuutse toksilisuse katse tulemused (vt meetodit C.1), eelistatavalt samade liikide kohta, kes on valitud kõnealuse katse jaoks, peaksid olema kättesaadavad. Tulemustest võib olla kasu uuritavate kontsentratsioonide sobiva vahemiku valimisel varajaste eluetappide katse jaoks. Teada peaksid olema uuritava aine lahustuvus vees (sealhulgas lahustuvus katses kasutatavas vees) ning aururõhk. Kättesaadavad peaksid olema usaldusväärne teadaoleva ja dokumenteeritud täpsusega analüütiline meetod uuritava aine kvantifitseerimiseks uuritavates lahustes ning avastamispiir.

Uuritavat ainet puudutav teave, mis on kasulik katsetingimuste loomiseks, on muu hulgas struktuurivalem, aine puhtus, püsivus valguse käes, püsivus katsetingimustes, pKa, P_{ow} ja kiire biolagunduvuse katse tulemused (vt meetodit C.4).

1.5. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

— viljastatud marjaterade üldine ellujäämine kontrollkatsetes ja, kus see on oluline, ka ainult lahustit sisaldavates anumates, peab olema suurem kui 2. ja 3. liites määratletud piirid või nende piiridega võrdne;

— lahustunud hapniku kontsentratsioon peab olema vahemikus 60–100 % õhuga küllastumisel saadud väärtusest (ASV) kogu katse jooksul;

— vee temperatuur ei tohi katsekambrites erineda rohkem kui ± 1,5°C või järjestikuste päevade lõikes mis tahes ajal katse jooksul ja see tuleks hoida katsealusele liigile ettenähtud temperatuurivahemikus (2. ja 3. liidet).

▼B

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Katsekambrid**

Kasutada võib igasuguseid klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist valmistatud anumaid. Anumate mõõtmed peaksid olema piisavalt suured, et võimaldada vastavust laadimisnormile (vt punkti 1.7.1.2). Katsekambrid soovitatakse paigutada uuringupiirkonnas juhuslikult. Kui laboratooriumis on süstemaatilisi mõjusid, mida on võimalik kontrollida väljajätmise abil, eelistatakse täielikult randomiseeritud süsteemile randomiseeritud plokksüsteemi, milles iga menetlus on esindatud igas plokis. Kui kasutatakse väljajätmist, tuleb seda võtta arvesse järgnevas andmete analüüsis. Katsekambrid tuleks varjestada soovimatute häirete eest.

1.6.2. **Kalaliigi valik**

Soovitatavad kalaliigid on toodud tabelis 1A. Siiski ei välista see ka teiste liikide kasutamist (näited on toodud tabelis 1B), kuid katsemenetlust võib olla tarvis kohandada sobivate katsetingimuste tagamiseks. Sellisel juhul tuleb liigi ja katsemeetodi valikut põhjendada.

1.6.3. **Sugukalade pidamine**

Sugukalade karja rahuldavatel tingimustel pidamise üksikasjad võib leida OECD juhendist TG 210 ([1]) 1 ja viidetes 2, 3, 4, 5, 6).

1.6.4. **Embrüote ja vastsete käitlemine**

Embrüod ja vastsed võivad uuritava ainega puutuda kokku suures anumas olevates võrgust külgedega või otstega väiksemates anumates, mis võimaldavad uuritaval lahusel läbi anuma voolata. Keeristeta voolu läbi nende väikeste anumate võib tekitada nii, et anumad on riputatud kangi külge, mis liigutab neid üles ja alla, kuid hoiab organismid kogu aeg lahuses; kasutada võib ka sifooniga läbivoolutussüsteemi. Lõheliste viljastatud marjaterad võib asetada raamistikule või võrkudele, mille avad on piisavalt suured, et võimaldada vastsetel pärast koorumist sealt läbi kukkuda. Poolstaatilistes katsetes, milles kogu vedelik vahetatakse iga päev, võib kasutada Pasteuri pipette embrüote ja vastsete eemaldamiseks (vt punkti 1.6.6).

Kui peamises katseanumas on marjaterade hoidmiseks kasutatud marjaterade konteinereid, reste ja võrke, tuleb need piirangud eemaldada pärast vastsete koorumist, ([1]) välja arvatud see, et võrgud tuleks säilitada kalade põgenemise vältimiseks. Kui on vajadus vastsed ümber paigutada, ei tohi nad kokku puutuda õhuga ning võrke ei tohi kasutada kalade vabastamiseks marjaterade konteineritest (mõnede vähem õrnade liikide nagu karpkala puhul ei ole selline ettevaatusabinõu vajalik). Selle ümberpaigutamise ajastamine erineb liigiti ja ümberpaigutamine ei pea alati olema vajalik. Poolstaatilise meetodi korral võib kasutada mõõteklaase või madalaid anumaid ja vajaduse korral võib asetada võrksõela mõõteklaasi põhjast natuke kõrgemale. Kui nende konteinerite ruumala on piisav, et vastata laadimisnõuetele (vt 1.7.1.2), ei ole embrüote või vastsete ümberpaigutamine vajalik.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test.

▼B

1.6.5. **Vesi**

Katses kasutatavaks veeks sobib vesi, mis vastab 4. liites esitatud aktsepteeritava lahjendamiseks kasutatava vee keemilisi omadusi puudutavatele nõuetele ja milles katsealune liik püsib elusana vähemalt sama kaua kui 2. ja 3. liites kirjeldatud vees. See peab olema katseperioodi jooksul püsiva kvaliteediga. pH peab jääma konstantseks vahemikus ± 0,5 pH-ühikut. Selle tagamiseks, et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katse tulemusi (näiteks moodustades uuritava ainega kompleksi) ega mõjutaks negatiivselt sugukarja võimet, tuleb vaheaegade järel võtta analüüsimiseks proove. Raskmetallid (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), enamik anioone ja katioone (nt Ca, Mg, Na, K, Cl ja SO_4), pestitsiidid (nt fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus), kogu orgaanilise süsiniku ja heljuva tahke aine sisaldus tuleks määrata näiteks iga kolme kuu järel, kui lahjendamiseks kasutatav vesi teatakse olevat suhteliselt püsiva kvaliteediga. Kui vähemalt ühe aasta jooksul on tõestatud püsiv vee kvaliteet, võib neid määramisi teha harvemini ja pikendada intervalle (nt iga kuue kuu järel).

1.6.6. **Uuritavad lahused**

Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse ette põhilahust lahjendades.

Põhilahus tuleks eelistatavalt valmistada lihtsalt uuritava aine segamise või loksutamisega lahjendamiseks kasutatavas vees, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid (nt segamist või ultraheli). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne). Lahustite või dispergantide (solubiliseerivate ainete) kasutamist tuleks vältida nii palju kui võimalik; siiski võib teatud juhtudel neid ühendeid olla tarvis sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks. Sobivad lahustid on näiteks atsetoon, etanool, metanool, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergandid on näiteks Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metüültselluloos ja HCO-40. Kergesti biolagunduvate ainete (nt atsetoon) ja/või väga lenduvate ainete kasutamisel tuleb olla ettevaatlik, sest need võivad põhjustada probleeme bakterite kasvu tõttu läbivooluga katsetes. Solubiliseeriva aine kasutamisel ei tohi sellel olla märkimisväärset mõju kalade ellujäämisele ega märgatavat negatiivset mõju varajastele eluetappidele, mida saab täheldada ainult lahustiga läbiviidava kontrollkatse abil. Siiski tuleks tarvitusele võtta kõik meetmed, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

Poolstaatilise meetodi korral võib järgida kahte erinevat uuendamise menetlust; kas i) uued uuritavad lahused valmistatakse puhastes anumates ja ellujäänud embrüod ja vastsed paigutatakse ettevaatlikult ümber uutesse anumatesse koos väikese koguse vana lahusega, vältides kokkupuudet õhuga, või ii) katsealused organismid hoitakse anumas, sellal kui osa (vähemalt kolmveerand) katses kasutatavast veest vahetatakse välja. Keskkonna uuendamine sõltub uuritava aine püsivusest, kuid vett soovitatakse uuendada iga päev. Kui esialgsetes püsivuse katsetes (vt punkti 1.4) ei ole uuritava aine kontsentratsioon püsiv (st on väljaspool 80–120 % nimiväärtust või langeb alla 80 % mõõdetud esialgsest kontsentratsioonist) uuendamise perioodil, tuleks kaaluda läbivoolukatse kasutamist. Igal juhul tuleks vältida vastsetele stressi tekitamist vee uuendamise käigus.

▼B

Läbivooluga katsete puhul tuleb kasutada süsteemi, mis pidevalt jaotab ja lahjendab uuritava aine põhilahust (nt dosaatorpump, proportsionaallahjendusseade, küllastus seadmega süsteem), et viia katsekambritesse sisse erinevad kontsentratsioonid. Põhilahuste ja lahjendamiseks kasutatava vee voolukiirust tuleb kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev ja need ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu uuringu jooksul. Sobivaks peetakse voolukiirust, mis vastab vähemalt katsekambri viiekordsele ruumalale 24 tunni jooksul (2).

1.7. KATSE KÄIK

Kasulik teave kalaembrüote ja rebukotiga vastsetega tehtud toksilisuse katsete kohta on kättesaadav kirjandusest, millest mõned näited on esitatud käesoleva teksti kirjanduse jaos (7, 8, 9).

1.7.1. **Kokkupuutetingimused**

1.7.1.1. *Kestus*

Katse peaks algama eelistatavalt 30 minuti jooksul pärast marjaterade viljastamist. Embrüod viiakse uuritavasse lahusesse enne või võimalikult kohe pärast looteketta jagunemise faasi algust ja kindlasti enne gastrulafaasi algust. Nende embrüote puhul, mis saadakse kaubandusliku tarnija käest, ei pruugi olla võimalik alustada katset kohe pärast viljastamist. Kuna katse tundlikkust võib uuringu alguse edasilükkamine tõsiselt mõjutada, tuleks uuringut alustada kaheksa tunni jooksul pärast viljastamist. Kuna vastseid ei söödeta kokkupuuteperioodi kestel, tuleks katse lõpetada vahetult enne seda, kui mis tahes vastsete rebukott ükskõik millises katsekambris on täielikult imendunud, või enne nälga suremise algust kontrollikatsetes. Kestus sõltub kasutatavast liigist. Mõned soovitatavad kestused on toodud 2. ja 3. liites.

1.7.1.2. *Laadimine*

Viljastatud marjaterade arv katse alguses peaks olema piisav, et vastata statistilistele nõuetele. Marjaterad tuleks jagada juhuvaliku alusel põhimõttel erinevate käitlusrühmade vahel ja ühe kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada vähemalt 30 viljastatud marjatera, võrdselt jagatuna (või võimalikult võrdselt, kuna teatud liikide korral on raske saada võrdseid partiisid) vähemalt kolme dubleeriva katsekambri vahel. Laadimisnorm (biomass uuritava lahuse ruumala kohta) peaks olema piisavalt väike, et õhustamiseta säilitada lahustunud hapniku kontsentratsioon, mis moodustab vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadavast väärtusest. Läbivooluga katsetes soovitatakse laadimisnormi, mis ei ületa 0,5 g/l 24 tunni kohta ega 5 g/l lahust mis tahes ajal (2).

1.7.1.3. *Valgus ja temperatuur*

Fotoperiood ja katses kasutatava vee temperatuur peaksid olema sobivad katseliigile (2. ja 3. liide). Temperatuuri monitooringuks võib olla vajalik kasutada täiendavat katseanumat.

▼B

1.7.2. **Uuritavad kontsentratsioonid**

Tavaliselt vajatakse uuritava aine viit kontsentratsiooni, mis erinevad konstantse kordaja võrra, mis ei ole suurem kui 3,2. Uuritavate kontsentratsioonide vahemiku valikul tuleks arvesse võtta LC_{50} ja kokkupuuteperioodi vahelist sõltuvust akuutsuse uuringu käigus. Teatud juhtudel võib olla sobiv kasutada vähem kui viit kontsentratsiooni, näiteks piirsisalduskatsete korral, või kasutada kitsamat kontsentratsioonivahemikku. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleb seda põhjendada. Aine kontsentratsioone, mis on suuremad kui 96 tunnile vastav LC_{50} või 100 mg/l, ükskõik kumb neist on madalam, ei ole tarvis uurida. Aineid ei peaks uuringus kasutama kogustes, mis ületavad nende lahustuvuspiiri katses kasutatavas vees.

Kui uuritava lahuse valmistamisel kasutatakse solubiliseerivat ainet (vt punkti 1.6.6), ei tohiks selle lõplik kontsentratsioon katseanumas olla suurem kui 0,1 ml/l ja see peaks olema sama kõikides katseanumates.

1.7.3. **Kontrollimised**

Lisaks katseseeriale tuleks kasutada ka ühte lahuse vee kontrollkatset (vajaduse korral dubleerituna) ning vajaduse korral ka ühte kontrollkatset, kus kasutatakse solubiliseerivat ainet (vajaduse korral dubleerituna).

1.7.4. **Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus**

Katse jooksul määratakse uuritava aine kontsentratsioonid korrapäraste ajavahemike tagant.

Poolstaatilistes katsetes, kus eeldatakse, et uuritava aine kontsentratsioon säilib vahemikus ± 20 % nimiväärtusest (st vahemikus 80–120 %; vt punkte 1.4 ja 1.6.6), soovitatakse analüüsida vähemalt kõige suuremaid ja madalamaid uuritavaid kontsentratsioone, nii värskelt valmistatuna kui ka vahetult enne uuendamist vähemalt kolmel korral võrdsete vahedega katse jooksul (st analüüsid tuleks teha samast lahusest saadud proovi põhjal – kui see on värskelt valmistatud ja uuendamisel).

Katsete puhul, milles ei eeldata, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest (uuritava aine püsivusandmete põhjal), on vajalik analüüsida kõik uuritavad kontsentratsioonid nii värskelt valmistatuna kui ka uuendamisel, kuid järgides sama režiimi (st vähemalt kolmel korral võrdsete vahedega katse jooksul). Uuritava aine kontsentratsiooni määramine enne uuendamist tuleks teha ainult ühes dubleerivas anumas iga uuritava kontsentratsiooni korral. Määramiste vahe võib olla kõige rohkem seitse ööpäeva. On soovitatav, et tulemused põhineksid mõõdetud kontsentratsioonidel. Siiski, kui on tõendeid selle kohta, et uuritava aine kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % nimiväärtusest või esialgsest mõõdetud kontsentratsioonist kogu katse jooksul, võivad tulemused põhineda nimi- või mõõdetud algväärtustel.

Läbivooluga katsete puhul sobib kasutada samasugust proovivõturežiimi, mida kirjeldati poolstaatiliste katsete puhul (kuid sellisel juhul ei mõõdeta „vanu” lahuseid). Siiski, kui katse kestus ületab seitset päeva, võib olla soovitav suurendada nädalasi proovivõtmise kordasid (nt kolm mõõtmisseeriat), et kindlustada uuritavate kontsentratsioonide püsivus.

▼B

Proovid võivad eeldada tsentrifuugimist või filtreerimist (nt kasutades poore suurusega 0,45 μm). Siiski, kuna tsentrifuugimine ega filtreerimine ei tundu alati eraldavat uuritava aine biosaadavat osa mittebiosaadavast, ei tule proovidele ilmtingimata neid toiminguid teha.

Katse jooksul tuleks mõõta lahustunud hapniku kontsentratsiooni, pH-d ja temperatuuri kõikides katseanumates. Kontrollkatsetes ja kõige suuremat kontsentratsiooni sisaldavas anumas mõõdetakse vee kogukaredus ja soolsus (kui see on oluline). Lahustunud hapniku kontsentratsiooni ja soolsust (kui see on oluline) tuleb mõõta minimaalselt kolm korda (katse alguses, keskel ja lõpus). Poolstaatiliste katsete puhul soovitatakse lahustunud hapniku kontsentratsiooni mõõta sagedamini, eelistatavalt enne ja pärast iga vee uuendamist või vähemalt kord nädalas. pH tuleks määrata poolstaatilistes uuendamiskatsetes iga vee uuendamise alguses ja lõpus ning vähemalt kord nädalas läbivooluga katsetes. Karedust tuleks mõõta üks kord iga katse vältel. Temperatuuri tuleks mõõta kord ööpäevas ja seda tuleks eelistatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katseanumas.

1.7.5. **Vaatlused**

1.7.5.1. *Embrüonaalse arengu staadium*

Embrüonaalne staadium (st gastrulafaas) uuritava ainega kokkupuute alguses tuleks võimalikult täpselt tõendada. Seda võib teha, kasutades sobivalt säilitatud ja puhastatud esinduslikku marjaterade proovi. Embrüonaalse staadiumi kirjeldamiseks ja illustreerimiseks võib tutvuda ka kirjandusega (2, 5, 10, 11).

1.7.5.2. *Koorumine ja ellujäämine*

Koorumise ja ellujäämise vaatlust tuleks teha vähemalt kord päevas ja vastavad arvud tuleks protokollida. Katse alguses võib olla soovitatav teha sagedasemaid vaatlusi (nt esimese kolme tunni jooksul iga 30 minuti järel), kuna teatud juhtudel võib eluspüsimise aeg olla olulisem kui ainult surmajuhtude arv (nt kui on tegemist akuutse toksilisuse mõjuga). Surnud embrüod ja vastsed tuleks eemaldada kohe, kui neid märgatakse, kuna need võivad kiiresti laguneda. Eriti hoolikas tuleks olla surnud isendite eemaldamisel, et mitte häirida või füüsiliselt kahjustada kõrvalolevaid marjaterasid/vastseid, kuna need on äärmiselt õrnad ja tundlikud. Kriteeriumid surma kohta varieeruvad vastavalt eluetapile:

— **marjaterade puhul**: eriti varastes etappides, märkimisväärne läbipaistvuse kadumine ja värvuse muutus, mis on põhjustatud valkainete koagulatsioonist ja/või sadestamisest, millele järgneb valge läbipaistmatu välimus;

— **embrüote puhul**: kehaliigutuste puudumine ja/või südamelöökide puudumine ja/või värvuse muutumine läbipaistmatuks sellisel liigil, mille embrüod on normaalselt läbipaistvad;

— **vastsete puhul**: liikumatus ja/või hingamise puudumine ja/või südamelöökide puudumine ja/või kesknärvisüsteemi värvumine valgeks ja läbipaistmatuks ja/või reaktsiooni puudumine mehaanilisele ärritajale.

▼B

1.7.5.3. *Kõrvalekalded välimuses*

Vastsete arv, kelle kehakujus täheldatakse kõrvalekaldeid ja/või pigmentatsiooni, ja rebukoti imendumise etapp tuleks dokumenteerida võrdsete vaheaegade järel sõltuvalt katse kestusest ja kirjeldatud kõrvalekallete iseloomust. Tuleks märkida, et embrüote ja vastsete kõrvalekalded esinevad loomuliku arengu käigus ja nende osakaal võib teatud liikidel olla mitmeid protsente kontrollkatse(te) suhtes. Kõrvalekaldega loomad tuleb lihtsalt eemaldada katseanumast, kui need surevad.

1.7.5.4. *Kõrvalekalded käitumises*

Kõrvalekalded käitumises, nt hingeldamine, koordineerimata ujumine ja ebatüüpiline liikumatus tuleks registreerida piisavate vaheaegade järel sõltuvalt katse kestusest. Need mõjud, kuigi neid on raske kvantifitseerida, võivad jälgimise korral aidata tõlgendada suremuse andmeid, st nendest võib saada teavet aine toksilisuse toimimisviisi kohta.

1.7.5.5. *Pikkus*

Katse lõpus on soovitatav mõõta individuaalsed pikkused; kasutada võib standardpikkust, pikkust ninamiku tipust kuni sabauime keskmiste kiirte alguseni või kogupikkust. Kui siiski esineb sabapoolset uimemädanikku või uimede erosiooni, tuleks kasutada standardpikkusi. Üldiselt peaks hästi läbiviidud katses pikkuse variatsioonikoefitsient dubleerivates kontrollkatsetes olema ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Kaal*

Katse lõpus võib mõõta individuaalsed kaalud; kuivmasse (24 tundi, 60 ^{o}C) eelistatakse märgmassidele (kuivaks pühituna). Üldiselt peaks hästi tehtud katses massi variatsioonikoefitsient dubleerivates kontrollkatsetes olema ≤ 20 %.

Nendest vaatlustest saadakse andmeid järgneva statistilise analüüsi jaoks:

— kumulatiivne suremus;

— tervete vastsete arv katse lõpus;

— koorumise alguse ja lõppemise aeg (st 90 % koorumine igas dubleerivas proovis);

— igal päeval kooruvate vastsete arv;

— ellujäänud loomade pikkus (ja kaal) katse lõpus;

— deformeerunud või ebatavalise välimusega vastsete arv;

— ebatavaliselt käituvate vastsete arv.

▼B

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Katse kavandamisel ja analüüsimisel soovitatakse kaasata statistikut, kuna käesolev meetod võimaldab märkimisväärset varieerumist eksperimentaalses plaanis, näiteks katsekambrite arvus, uuritavate kontsentratsioonide arvus, viljastatud marjaterade algses arvus ja mõõdetavates parameetrites. Pidades silmas katse kavandamises olevaid võimalusi, ei ole siin antud konkreetseid juhiseid statistiliste menetluste kohta.

Kui tuleb määrata LOEC/NOEC, tuleb variatsioone analüüsida igas dubleerivas rühmas, kasutades dispersioonanalüüsi (ANOVA) või kooslustabeli menetlusi. Selleks, et teha mitmekordseid võrdlusi üksikute kontsentratsioonide ja kontrollkatsete kontsentratsioonide korral saadud tulemuste vahel, võiks olla kasu Dunnetti meetodist (12, 13). Olemas on teisi kasulikke näiteid (14, 15). ANOVAt või teisi menetlusi kasutades saadud mõju suurus (st katse jõud) tuleks välja arvutada ja avaldada. Tuleb märkida, et kõik punktis 1.7.5.6 toodud vaatlused ei sobi statistiliseks analüüsiks ANOVA abil. Kumulatiivse suremuse ja katse lõpus tervete vastsete arvu analüüsimiseks võiks kasutada probitmeetodeid.

Kui tuleb kindlaks määrata LC/EC_X, tuleks sobiv(ad) kõver(ad), näiteks logistiline kõver, sobitada huvipakkuvate andmetega selliste statistilise meetodi abil nagu näiteks vähimruutude meetod või mittelineaarne vähimruutude meetod. Kõvera(te)s tuleks kasutada selliseid muutujaid, et oleks võimalik otseselt hinnata ära soovitud LC/EC^X ja selle standardviga. See kergendab suuresti LC/EC^X jaoks usalduspiiri väljaarvutamist. Kui ei ole head põhjust eelistada erinevaid usaldusnivoosid, tuleks määrata kahepoolne 95 % usaldusnivoo. Kõverate sobitamise menetlus peaks eelistatavalt andma aluse sobitamise olulisuse või selle puudumise hindamiseks. Kõverate sobitamiseks võib kasutada graafilist meetodit. Regressioonanalüüs sobib kõikide punktis 1.7.5.6 esitatud vaatlusandmete kohta.

2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, kui uuritavates lahustes mõõdetud mürkaine kontsentratsioonid on analüütilise meetodi avastamispiiri lähedal. Tulemuste tõlgendamisel selliste kontsentratsioonide korral, mis on suuremad aine lahustuvusest vees, tuleks samuti olla ettevaatlik.

2.3. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.3.1. **Uuritav aine:**

— füüsikaline loomus ning olulised füüsikalis-keemilised omadused;

— keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas puhtus ja uuritava aine kvantifitseerimiseks kasutatav analüütiline meetod (vajaduse korral).

▼B

2.3.2. **Katsealused liigid:**

— teaduslik nimi, liin, eellasteks olnud kalade arv (st kui mitut emaskala kasutati katses vajaliku arvu marjaterade saamiseks), päritolu ja viljastatud marjaterade kogumise meetod ning edaspidine käitlemine.

2.3.3. **Katsetingimused:**

— kasutatav katsemenetlus (nt poolstaatiline või läbivooluga, aeg viljastamisest uuringu alguseni, laadimine jne);

— fotoperiood(id);

— katse kavandamine (nt katse- ja dubleerivate anumate arv, embrüote arv dubleerivas katses);

— põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, tuleb esitada ka selle kontsentratsioon);

— uuritavate kontsentratsioonide nimiväärtused, mõõdetud väärtused, nende saamise vahendid ja standardhälbed katseanumas ja meetod, mille alusel need on saadud, ning kui uuritava aine lahustuvus vees on uuritud kontsentratsioonidest väiksem, siis tuleks esitada tõendid selle kohta, et need mõõtmised vastavad uuritava aine kontsentratsioonidele lahuses;

— lahjendamiseks kasutatava vee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloori jääktasemed (kui mõõdetakse), kogu orgaaniline süsinik, suspendeeritud tahked ained, katsekeskkonna soolsus (kui mõõdetakse) ja mis tahes muud tehtud mõõtmised;

— vee kvaliteet katseanumas: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon.

2.3.4. **Tulemused:**

— uuritava aine püsivuse esialgsete uuringute tulemused;

— tõendid selle kohta, et kontrollkatsed vastasid katsealuste liikide korral üldisele aktsepteeritavale ellujäämise normile (2. ja 3. liide);

— andmed suremuse/ellujäämise kohta embrüo ja vastse staadiumites ning üldine suremus/ellujäämine;

— koorumiseks kulunud päevad ja koorunud isendite arv;

— andmed pikkuse (ja kaalu) kohta;

— võimalike morfoloogiliste kõrvalekallete esinemine ja kirjeldus;

— võimalike käitumises ilmnenud mõjude esinemine ja kirjeldus;

— statistiline analüüs ja andmete töötlemine;

— katsete puhul, milles kasutatakse ANOVA analüüsi: vähim toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) $p = 0,05$ korral täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) iga hinnatud vastuse kohta, kaasa arvatud kasutatud statistiliste menetluste kirjeldus ja viide selle kohta, milline oli avastatud mõju suurus;

▼B

— katsete puhul, milles kasutatakse regressioonitehnikat: LC/EC_X ja usaldusvahemikud ning selle arvutamiseks kasutatud sobitatud mudeli graafik;

— käesolevast katsemeetodist mis tahes kõrvalekallete selgitamine.

3. **VIITED**

1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121–173.

6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328–330.

7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (Brachydanio rerio) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61–71.

8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807–821.

9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. UI. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129–145.

10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096–1121.

13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482–491.

14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321–334.

16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, Brachydanio rerio. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126–134.

18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231–236.

19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19–28.

20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, Oryzias latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (Oryzias latipes). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189–1203.

23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1–58.

Tabel 1a

Katseks soovitatavad kalaliigid

MAGEVEEKALAD
Oncorhynchus mykiss Vikerforell (9, 16)
Danio rerio Sebrakala (7, 17, 18)
Cyprinus caprio Karpkala (8, 19)
Oryzias latipes Jaapani riisikala (20, 21)
Pimephales promelas Pakspea lepamaim (8, 22)

▼B

Tabel 1b

Näiteid teistest hästi dokumenteeritud liikidest, mida on samuti kasutatud

MAGEVEEKALAD	MEREKALAD
Carassius auratus Hõbekoger (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23, 24, 25)
Lepomis macrochirus Bluegill (8)	*Clupea harengus* Harilik heeringas (24, 25)
	Gadus morhua Tursk (24, 25)
	Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (23, 24, 25)

▼B

1.liide

JUHEND TOKSILISUSE KATSE TEGEMISEKS VÖÖDILISE PISIDAANIO (*BRACHYDANIO RERIO*) EMBRÜOTE JA REBUKOTIGA VASTSETEGA

SISSEJUHATUS

Vöödiline pisidaanio on pärit India Coromandeli rannikualalt, kus ta elutseb kiirevoolulistes jõgedes. Vöödiline pisidaanio on levinud akvaariumikala karpkalalaste sugukonnast ja teavet tema hoolitsemise ja tema kasvatamise kohta võib leida tavalistes troopilisi kalu käsitlevates raamatutes. Ülevaate vöödilise pisidaanio bioloogiast ja kasutamisest kalandusalastes uuringutes on koostanud Laale (1).

Kala kasvab harva pikemaks kui 45 mm. Keha on silindrikujuline 7–9 tumesinise horisontaalse hõbedase triibuga. Need triibud ulatuvad sabapoolsete ja anaalsete uimedeni. Selg on oliivrohelist värvi. Isaskalad on emaskaladest saledamad. Emaskalad on hõbedasemad ja nende alakeha on laienenud, eriti enne kudemist.

Täiskasvanud kalad on võimelised taluma suuri temperatuuri-, pH- ja vee kareduse kõikumisi. Siiski tuleb selliste tervete kalade saamiseks, kellelt saaks kvaliteetseid marjaterasid, tagada optimaalsed tingimused.

Kudemise ajal ajab isaskala emaskala taga ja puksib teda ning kui emaskala väljutab marjaterad, siis need ka viljastatakse. Läbipaistvad ja mittekleepuvad marjaterad vajuvad põhja, kus täiskasvanud kalad võivad need ära süüa. Kudemist mõjutab valgus. Kui valgustingimused on hommikul piisavad, koeb vöödiline pisidaanio tavaliselt varajastel hommikutundidel pärast päikesetõusu.

Emaskala võib anda nädalaste vahedega mitmesajalisi marjaterade partiisid.

EELLASTEKS OLNUD KALADE, PALJUNEMISE JA VARAJASTE ELUSTAADIUMITE TINGIMUSED

Välja tuleks valida sobiv arv terveid kalasid ja hoida need sobivas vees (nt 4. liide) vähemalt kaks nädalat enne planeeritud kudemist. Kalade rühmal tuleks võimaldada vähemalt ühe korra sigida enne katses kasutatava marjaterade partiide saamist. Kalade tihedus selle perioodi jooksul ei tohiks olla suurem kui 1 gramm kalu liitri kohta. Regulaarne veevahetus või puhastussüsteemi kasutamine võib võimaldada suuremat tihedust. Temperatuur hoiuanumates tuleks hoida 25 + 2 °C. Kaladele tuleks anda vahelduvat toitu, mis võiks sisaldada näiteks sobivat kaubanduslikku kuivtoitu, elavaid just koorunuid soolavähikesi (*Arthemia*), surusääski, kiivrikke (*Daphnia*) ja valgeliimuklasi (*Enchytraeidae*).

Allpool on visandatud kaks menetlust, mida kasutades on saadud katseks vajalikul määral terveid, viljastatud marjaterasid.

i) Kaheksa emaskala ja 16 isaskala pannakse anumasse, mis sisaldab 50 liitrit lahjendamiseks kasutatavat vett ja mis on varjatud otsese valguse eest ja mida häiritakse nii vähe kui võimalik vähemalt järgneva 48 tunni jooksul. Kudemiskandik asetatakse akvaariumi põhja katse algusele eelneva päeva pärastlõunal. Kudemiskandik koosneb (pleksiklaasist või muust sobivast materjalist) raamist kõrgusega 5–7 cm, millel on 2–5 mm silmadega jämedakoeline võrk üleval ja 10–30 μm tihe võrk põhjas. Raami jämedakoelise võrgu külge kinnitatakse mitmeid lahti keeratud nailonnöörist tehtud „kudemispuid". Kui kalad on olnud pimedas 12 tundi, süüdatakse nõrk lamp, mis algatab kudemise. Kaks kuni neli tundi pärast kudemist eemaldatakse kudemiskandik ja marjaterad kogutakse kokku. Kudemiskandik takistab kaladel marjaterasid süüa ning samal ajal võimaldab see kergesti marjaterad kokku koguda. Kalade rühm peaks olema kudenud vähemalt ühe korra enne katses kasutatava marjaterade partii kudemist.

▼B

ii) Viis kuni kümme isast ja emast kala hoitakse eraldi vähemalt kaks nädalat enne planeeritavat kudemist. 5–10 päeva pärast laienevad emaskalade alakehad ja nende genitaalide papillid muutuvad nähtavaks. Isakaladel nimetatud papillid puuduvad. Kudemine toimub kudemisanumates, mis on varustatud võrgust tehtud väärpõhjaga (nagu eelpool). Anum täidetakse lahjendamiseks kasutatava veega nii, et vee sügavus võrgu kohal on 5–10 cm. Päev enne planeeritavat kudemist asetatakse mahutisse üks emaskala ja kaks isaskala. Vee temperatuuri tõstetakse, kuni see on ühe kraadi võrra kõrgem aklimatsioonitemperatuurist. Valgus kustutatakse ja anumat häiritakse nii vähe kui võimalik. Hommikul süüdatakse nõrk lamp, mis algatab kudemise. 2–4 tunni pärast eemaldatakse kalad ja marjaterad korjatakse kokku. Kui vajatakse suuremaid marjaterade partiisid kui need, mida saab ühelt emaskalalt, võib üles seada piisaval hulgal paralleelseid kudemisanumaid. Kui registreeritakse iga emaskala paljunemise edukust enne katset (partii suurus ja kvaliteet), võib sigimiseks välja valida suurima reproduktiivsusega emaskalad.

Marjaterad tuleks viia katseanumasse klaastorude abil (sisediameeter vähemalt 4 mm), millel on elastne imiotsak. Marjaterade ümberpaigutamisel kaasamineva vee hulk peaks olema võimalikult minimaalne. Marjaterad on veest raskemad ja vajuvad torust välja. Hoolitseda tuleks selle eest, et marjaterad (ja vastsed) ei puutuks kokku õhuga. Tuleks teha partii(de) proovi(de) mikroskoopiline uuring, et kindlustada esimestes arengustaadiumides anomaaliate puudumine. Marjaterade desinfitseerimine ei ole lubatud.

Marjaterade suremuse määr on kõrgem esimese 24 tunni jooksul pärast viljastamist. Selle perioodi jooksul on suremus sageli 5–40 %. Ebaõnnestunud viljastamise või arengukahjustuste tulemusel marjaterad degenereeruvad. Marjaterade partii kvaliteet tundub sõltuvat emaskalast, kuna mõned emaskalad annavad pidevalt kvaliteetseid marjaterasid ja teised ei tee seda mitte kunagi. Samuti on erinevatel partiidel erinev arenemis- ja koorumiskiirus. Edukalt viljastatud marjaterade ja rebukotivastsete ellujäämus on hea, tavaliselt üle 90 %. 25 °C juures kooruvad marjaterad 3.–5. päeval pärast viljastamist ning rebukott imendub ligikaudu 13. päeval pärast viljastamist.

Embrüonaalset arengut on hästi kirjeldanud Hisaoka ja Battle (2). Tänu marjaterade ja koorumisjärgsete vastsete läbipaistvusele on võimalik jälgida kalade arengut ja vaadelda väärarenguid. Ligikaudu neli tundi pärast kudemist on võimalik eristada viljastamata marjaterasid viljastatud marjateradest (3). Selle kindlakstegemiseks asetatakse marjaterad ja vastsed väikese ruumalaga katseanumatesse ja neid uuritakse mikroskoobi all.

Katsetingimused, mida rakendatakse varajastel elustaadiumitel, on esitatud 2. liites. Optimaalne lahjendamiseks kasutatava vee pH ja karedus on vastavalt 7,8 ja 250 mg $CaCO_3$/l.

ARVUTUSED JA STATISTIKA

Pakutakse välja kaheetapiline lähenemine. Kõigepealt analüüsitakse statistiliselt suremuse, väärarengu ja koorumise aega puudutavaid andmeid. Seejärel hinnatakse statistiliselt keha pikkust nende kontsentratsioonide korral, mille puhul ei täheldatud nimetatud parameetritele negatiivset mõju. Selline lähenemine on soovitatav, kuna mürkaine võib valikuliselt surmata väiksemad kalad, aeglustada koorumiseks vajalikku aega ja põhjustada suuri väärarenguid, mis toob endaga kaasa nihkega pikkuse mõõtmised. Lisaks on sellisel viisil võimalik mõõta ligikaudu sama arvu kalu iga menetluse korral, mis kindlustab katsestatistika valiidsuse.

▼B

LC_{50} JA EC_{50} MÄÄRAMINE

Arvutatakse ellujäänud marjaterade ja vastsete arv ning seda korrigeeritakse vastavalt Abbotti valemile (4) suremusega kontrollkatsetes:

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

kus

P = korrigeeritud ellujäämise protsent

P' = uuritava kontsentratsiooni korral täheldatud ellujäämise protsent

C = ellujäämine kontrollkatses

Kui võimalik, määratakse katse lõpus sobivat meetodit kasutades LC_{50}.

Kui EC_{50} statistikasse soovitakse lisada morfoloogiliste kõrvalekallete esinemist, võib vastavad juhised leida viitest Stephan (5).

LOEC JA NOEC HINDAMINE

Marjateradega ja rebukotiga vastsete uuringu eesmärk on võrrelda nullist erineva kontsentratsiooniga lahuseid kontrollkatsega, st kindlaks määrata LOEC. Seetõttu tuleks kasutada korduvaid võrdlusmenetlusi (6, 7, 8, 9, 10).

VIITED

1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121–173.

2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173–181.

4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1–333.

5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69–81.

6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096–1121.

7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482–491.

8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103–117.

9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519–531.

10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

▼B

2. liide

KATSETINGIMUSED, KESTUS JA ELLUJÄÄMISKRITEERIUMID SOOVITATAVATE LIIKIDE JAOKS

Liik	Temperatuur (°C)	Soolsus (0/00)	Fotoperiood (tundides)	Etappide kestus (päevades)		Tüüpiline katse kestus	Ellujäämus kontrollkatses (minimaalne %)	
				Embrüo	Rebukotiga vastne		Koorumisprotsent	Pärast koorumist
MAGEVEEKALAD								
Brachydanio rerio Vöödiline pisidaanio	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 5 päeva pärast koorumist (8–10 päeva)	80	90
Oncorhynchus mykiss Vikerforell	10 ± 1 ([1]) 12 ± 1 ([2])	—	0 ([a])	30–35	25–30	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 20 päeva pärast koorumist (50–55 päeva)	66	70
Cyprinus carpio Harilik karpkala	21–25	—	12–16	5	> 4	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4 päeva pärast koorumist (8–9 päeva)	80	75
Oryzias latipes Jaapani riisikala	24 ± 1 ([1]) 23 ± 1 ([2])	—	12–16	8–11	4–8	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 5 päeva pärast koorumist (13–16 päeva)	80	80
Pimephales promelas Pakspea lepamaim	25 ± 2	—	16	4–5	5	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4 päeva pärast koorumist (8–9 päeva)	60	70

([1]) Embrüote puhul.
([2]) Vastsete puhul.
([a]) Embrüod ja vastsed pimeduses kuni üks nädal pärast koorumist, välja arvatud ülevaatamise ajal. Seejärel vähene valgus kogu katse jooksul.

▼B

3. liide

Katsetingimused, kestus ja ellujäämiskriteeriumid teiste hästi dokumenteeritud liikide korral

Liik	Temperatuur (°C)	Soolsus (0/00)	Fotoperiood (Tundides)	Etappide kestus (Päevades)		Tüüpiline embrüote ja rebukotiga vastsete katse kestus	Ellujäämus kontrollkatses (minimaalne %)	
				Embrüo	Rebukotiga vastne		Koorumisprotsent	Pärast koorumist
MAGEVEEKALAD								
Carassius auratus Kuldkala	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4 päeva pärast koorumist (7 päeva)	—	80
Leopomis macrochirus Bluegill kuukala	21 ± 1	—	16	3	> 4	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4 päeva pärast koorumist (7 päeva)	—	75
MEREKALAD								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22–25	15–22	12	1,5	10	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 5 päeva pärast koorumist (6–7 päeva)	80	60
Clupea harengus Heeringas	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 3 päeva pärast koorumist (23–27 päeva)	60	80
Gadus morhua Tursk	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 3 päeva pärast koorumist (18 päeva)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15–30	12	—	—	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4/7 päeva pärast koorumist (28 päeva)	> 75	80

▼B

4. LIIDE

MÕNED AKTSEPTEERITAVA LAHJENDAMISEKS KASUTATAVA VEE KEEMILISED OMADUSED

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked ained osakestena	< 20 mg/l
Kogu orgaaniline süsinik	< 2 mg/l
Ammoniaak (ioniseerimata)	< 1µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide kogusisaldus	< 50 ng/l
Kloori kogusisaldus orgaanilistes ühendites	< 25 ng/l

▼B

C.16. **MESILASED – AKUUTSE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE**

1. **MEETOD**

Käesolev akuutse toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 213 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev toksilisuse katse on laboratoorne meetod, mis on kavandatud taimekaitsetoodete ja teiste kemikaalide suukaudse akuutse toksilisuse hindamiseks täiskasvanud töömesilaste abil.

Ainete toksiliste omaduste hindamisel võib nõuda akuutse suukaudse toksilisuse kindlaksmääramist mesilaste puhul, st siis, kui mesilaste kokkupuutumine antud kemikaaliga on tõenäoline. Akuutse suukaudse toksilisuse uuring tehakse selleks, et määrata kindlaks pestitsiidide ja teiste kemikaalide toksilisus mesilatele. Käesoleva katse tulemusi tuleks kasutada edasise hindamise vajaduse määramiseks. Täpsemalt võib seda meetodit kasutada programmides, milles pestitsiidide poolt mesilastele tekitatud ohte hinnatakse astmeliselt, ja mis põhinevad järjestikusel üleminekul toksilisuse laboratoorsete katsete juurest poolväli-ja välikatseteni (1). Pestitsiide võib uurida nii toimeainetena kui ka valmististena.

Mesilaste tundlikkuse ja katsemenetluse täpsuse kindlakstegemiseks tuleks kasutada toksilisuse standardit.

1.2. MÕISTED

Akuutne suukaudne toksilisus – negatiivne mõju, mis ilmneb hiljemalt 96 tunni jooksul pärast uuritava aine ühe doosi suukaudset manustamist.

Doos – tarbitud uuritava aine kogus. Doosi väljendatakse uuritava aine massina (µg) katselooma kohta (µg/mesilane). Tegelikku doosi iga mesilase kohta ei saa välja arvutada, kuna mesilasi söödetakse kollektiivselt, kuid kindlaks on võimalik teha keskmine doos (kogu tarbitud uuritava aine/mesilaste arv ühes puuris).

LD_{50} (letaalse doosi mediaan), suukaudne – statistiliselt saadud aine ühekordne doos, mis võib suukaudsel manustamisel põhjustada surma 50 %-l isenditest. LD_{50} väärtus avaldatakse uuritava aine mikrogrammides (µg) mesilase kohta. Pestitsiidide korral võib uuritav aine olla kas toimeaine või valmistis, milles on üks või mitu toimeainet.

Suremus – isend loetakse surnuks, kui see on täielikult liikumatu.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Täiskasvanud töömesilased *(Apis mellifera)* viiakse kokku sahharoosilahuses dispergeeritud uuritava aine erinevate doosidega. Seejärel söödetakse mesilastele sama toitu ilma uuritava aineta. Suremus registreeritakse iga päev vähemalt 48 tunni jooksul ja võrreldakse kontrollkatses saadud väärtustega. Kui suremuse määr suureneb 24 h ja 48 h vahel ning kui suremus kontrollrühmas jääb aktsepteeritavale tasemele, st < 10 %, on katse kestust sobiv maksimaalselt 96 tunnini pikendada. Tulemusi analüüsitakse, et arvutada välja LD_{50} väärtused 24. ja 48. tunni jaoks ja juhul, kui uuringut pikendatakse, siis ka 72. ja 96. tunni jaoks.

▼B

1.4. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

— keskmine suremus kõikides kontrollkatsetes kokku ei tohi katse lõpul ületada 10 %;

— toksilisuse standard LD_{50} vastab kõnealusele vahemikule.

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. **Mesilaste kogumine**

Kasutada tuleks sama tõugu noori töömesilasi, st mesilased peaksid olema samas vanuses, samamoodi toidetud jne. Mesilased peaksid olema pärit piisavalt toidetud, tervetest ja võimalikult haigusvabamatest mesilasemaga kolooniatest, millel on tuntud ajalugu ja füsioloogiline staatus. Mesilased tuleks kokku koguda kasutamispäeva hommikul või katsele eelneval õhtul ja hoida uuringu tingimustes järgmise päevani. Sobivad on need mesilased, mis on kogutud raamidelt, millel ei ole pesakondi. Tuleks vältida kogumist varakevadel või hilissügisel, kuna mesilaste füsioloogia on sellel ajal muutunud. Kui katse tuleb teha varakevadel või hilissügisel, võib mesilastel lasta kooruda inkubaatoris ja neid võib kasvatada ühe nädala jooksul „mesilasleival" (kärjest kogutud õietolm) ja sahharoosilahusega. Toksilisuse katses ei tohiks kasutada mesilasi, keda on ravitud keemiliste ainetega, näiteks antibiootikumid, varroatoosivastased tooted jms nelja nädala jooksul alates viimase ravimenetluse lõpust.

1.5.2. **Pidamis- ja söötmistingimused**

Kasutatakse kergesti puhastatavaid ja hästiventileeritud puure. Kasutada võib mis tahes materjalist, nt roostevabast terasest, traatvõrgust, plastmassist puure või ühekordselt kasutatavad puupuure jms. Eelistatav mesilaste arv on kümme mesilast puuri kohta. Katsepuuri suurus peaks olema sobiv mesilaste arvuga, st tagama piisava ruumi.

Mesilased tuleks hoida katseruumis pimedas temperatuuril 25 ± 2 °C. Kogu katse jooksul tuleks registreerida suhteline õhuniiskus, mis normaalselt on ligikaudu 50–70 %. Käitlemisemenetlusi, sealhulgas ainega töötlemist ja vaatlusi, võib teha (päeva)valguses. Toiduks kasutatakse sahharoosi vesilahust, mille lõppkontsentratsioon on 500 g/l (50 massi-/mahuprotsenti). Pärast nimetatud uuritava doosi andmist tuleks toitu anda *ad libitum*. Toitmissüsteem peaks võimaldama registreerida toidu manustamise iga puuri kohta (vt punkti 1.6.3.1). Kasutada võib klaastoru (ligikaudu 50 mm pikk ja 10 mm läbimõõduga, mille avatud ots kitseneb kuni ligikaudu 2 millimeetrini).

1.5.3. **Mesilaste ettevalmistamine**

Kogutud mesilased jagatakse juhuvaliku alusel katsepuuridesse, mille paigutus katseruumis on juhuslik.

▼B

Mesilastele võib toitu mitte anda kuni 2 tundi enne katse algust. Mesilastele soovitatakse enne aine mõjule allutamist toitu mitte anda, et kõik mesilased oleksid katse alguses seedekulgla sisu mõttes võrdses olukorras. Surevaid mesilasi ei tuleks kasutada ja need asendatakse enne katse algust tervete mesilastega.

1.5.4. **Dooside ettevalmistamine**

Kui uuritav aine on veega segunev ühend, võib selle dispergeerida kohe 50 % sahharoosilahuses. Tehniliste valmististe ja madala veeslahustuvusega ainete korral võib kasutada kandeaineid, näiteks orgaanilised lahustid, mesilastele vähemürgised emulgaatorid või dispergandid (nt atsetoon, dimetüülformamiid, dimetüülsulfoksiid). Kandeaine kontsentratsioon sõltub uuritava aine lahustuvusest ja see peaks olema sama kõikide uuritavate kontsentratsioonide korral. Siiski on üldiselt sobiv kandeainekontsentratsioon 1 % ja seda ei tohiks ületada.

Tuleks valmistada sobivad kontroll-lahused, st kui uuritava aine lahustamiseks kasutatakse lahustit või disperganti, tuleks kasutada kahte iseseisvat kontrollrühma: vesilahust ja sahharoosilahust, milles lahusti/kandeaine kontsentratsioon on sama mis doseerimislahustes.

1.6. KATSE KÄIK

1.6.1. **Katse- ja kontrollrühmad**

Uuritavate dooside ja duplikaatide arv peaks vastama statistilistele nõuetele LD_{50} kindlaksmääramiseks 95 % usalduspiiriga. Tavaliselt nõutakse katse jaoks viit doosi geomeetrilises jadas, mille tegur ei ületa 2.2 ja mis katavad LD_{50} jaoks vajaliku vahemiku. Siiski tuleb lahjendusaste ja doseeritavate kontsentratsioonide arv kindlaks määrata vastavalt toksilisuskõvera (doos vs suremus) tõusule ja tulemuste analüüsimiseks valitud statistilisele meetodile. Vahemiku kindlaksmääramise katse võimaldab valida välja doseerimiseks sobivad kontsentratsioonid.

Iga uuritava kontsentratsiooniga lahust tuleks doseerida vähemalt kolmele dubleerivale katserühmale, milles igas on 10 mesilast. Lisaks katseseeriale tuleks kasutada vähemalt kolme kontrollpartiid, milles igaühes on 10 mesilast. Kontrollpartiid peaksid olema ka kasutatavate lahustite/kandeainete jaoks (vt punkti 1.5.4).

1.6.2. **Toksilisuse standard**

Katseseerias peaks olema ka toksilisuse standard. Eeldatava LD_{50} väärtuse katmiseks tuleks valida vähemalt kolm doosi. Iga uuritavat doosi tuleks kasutada vähemalt kolme dubleeriva puuri korral, milles igaühes on 10 mesilast. Eelistatav toksilisuse standard on dimetoaat, mille peroraalse LD_{50} dokumenteeritud väärtus 24 tunni jaoks on vahemikus 0,10–0,35 μg toimeainet mesilase kohta (2). Siiski võib kasutada ka teisi toksilisuse standardeid juhul, kui on võimalik hankida piisavalt andmeid, et tõestada eeldatud reaktsiooni doosile (nt paratioon).

▼B

1.6.3. **Kokkupuude**

1.6.3.1. *Doseerimine*

Igale mesilaste katserühmale tuleb anda 100–200 µl 50 % sahharoosi vesilahust, mis sisaldab sobivas kontsentratsioonis uuritavat ainet. Suuremat ruumala on vaja vähelahustuvate, madala toksilisusega või valmistises madala kontsentratsiooniga toodete korral, sest siis tuleb sahharoosilahuses kasutada suuremaid koguseid. Rühma kohta manustatud töödeldud toidu hulka tuleb jälgida. Pärast tarbimist (tavaliselt 3–4 tunni jooksul) tuleb toiteseade eemaldada puurist ja asendada teisega, mis sisaldab ainult sahharoosilahust. Sahharoosilahuseid antakse seejärel *ad libitum*. Mõningate ühendite puhul võib suure kontsentratsiooniga uuritavatest doosidest keeldumine põhjustada selle, et toitu tarbitakse vähe või üldse mitte. Töödeldud toit, mida ei ole tarbitud maksimaalselt 6 tunni jooksul, tuleks asendada ainult sahharoosilahusega. Tarbitud töödeldud toidu hulka tuleks hinnata (nt järelejäänud töödeldud toidu ruumala/massi mõõtmine).

1.6.3.2. *Kestus*

Katse kestus on eelistatavalt 48 tundi alates uuritava lahuse asendamisest ainult sahharoosi sisaldava lahusega. Kui suremus tõuseb jätkuvalt rohkem kui 10 % pärast esimest 24 tundi, tuleks katse kestust pikendada maksimaalselt 96 tunnini, eeldusel, et suremus kontrollrühmas ei ületa 10 %.

1.6.4. **Vaatlused**

Suremus registreeritakse 4. tunnil pärast katse algust ja seejärel 24. ja 48. tunnil (st pärast doseerimist). Kui osutub vajalikuks pikendatud vaatlusperiood, tuleks edasisi hindamisi teha 24tunniste vahedega kuni 96. tunnini, eeldusel et suremus kontrollkatses ei ületa 10 %.

Rühma kohta manustatud toidu hulk tuleb kindlaks määrata. Töödeldud ja töötlemata toidu tarbimismäärade võrdlemine antud 6 tunni jooksul võib anda teavet töödeldud toidu maitsvuse kohta.

Kõik katseperioodi jooksul tuvastatud kõrvalekalded käitumises tuleks registreerida.

1.6.5. **Piirsisalduskatse**

Teatud juhtudel (nt kui eeldatakse, et uuritav aine on madala toksilisusega) tuleks teha piirsisalduskatse, kasutades 100 µg toimeainet mesilase kohta, eesmärgiga näidata, et LD_{50} on sellest väärtusest suurem. Tuleks kasutada sama menetlust, st seal peaks olema kolm dubleerivat katserühma uuritava doosi kohta, asjaomased kontrollkatsed, tarbitud töödeldud toidu koguse hindamine ning toksilisuse standardi kasutamine. Kui esineb suremust, tuleks teha täielik uuring. Kui täheldatakse subletaalseid mõjusid (vt punkti 1.6.4), tuleks need registreerida.

▼B

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

2.1. ANDMED

Andmed tuleks kokku võtta tabelina, näidates ära iga menetlusrühma, kontrollrühma ja toksilisuse standardi rühma kohta kasutatud mesilaste arvu, suremuse iga vaatlusaja kohta ja ebatavalise käitumisega mesilaste arvu. Suremuse andmeid tuleks analüüsida sobiva statistilise meetodiga (nt probitanalüüs, libisev keskväärtus, binomiaalne tõenäosus) (3, 4). Doosi-reaktsiooni sõltuvused koostatakse iga soovitatava vaatlusaja kohta ja arvutatakse kõverate tõusud ning letaalse doosi mediaanid (LD_{50}) 95 % usalduspiiri jaoks. Kontrollrühma suremust võib korrigeerida, kasutades Abbotti korrigeerimist (4, 5). Kui töödeldud toit ei ole täielikult tarbitud, tuleks kindlaks määrata tarbitud uuritava aine doos rühma lõikes. LD_{50} tuleks avaldada uuritava aine µg-des mesilase kohta.

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. **Uuritav aine:**

— füüsikaline loomus ning olulised füüsikalis-keemilised omadused (nt püsivus vees, aururõhk);

— keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas struktuurivalem, puhtus (st pestitsiidide korral toimeaine(te) loomus ja kontsentratsioon).

2.2.2. **Katsealused liigid:**

— teaduslik nimi, tõug, ligikaudne vanus (nädalates), kogumismeetod, kogumise kuupäev;

— teave katsemesilaste kogumiseks kasutatud kolooniate kohta, sealhulgas nende tervisliku seisundi, täiskasvanud isendite haiguste, eelneva ravi jms kohta.

2.2.3. **Katsetingimused:**

— katseruumi temperatuur ja suhteline õhuniiskus;

— pidamistingimused, sealhulgas puuride tüüp, suurus ja materjal;

— põhi- ja katselahuste valmistamismeetodid (kui kasutatakse lahustit, tuleb esitada ka selle nimetus ja kontsentratsioon);

— katse kavandamine, nt kasutatavad uuritavad kontsentratsioonid ja nende arv, kontrollkatsete arv; iga uuritava kontsentratsiooni ja kontrollrühma kohta dubleerivate puuride arv ja mesilaste arv puuri kohta;

— katse kuupäev.

▼B

2.2.4. **Tulemused:**

— kui tehakse esialgse vahemiku leidmise uuring, siis selle tulemused;

— lähteandmed: suremus iga doosi lõikes igal vaatlushetkel;

— doosi-reaktsiooni sõltuvuse graafik katse lõpus;

— LD_{50} väärtused 95 % usalduspiiriga iga soovitatava vaatlushetke lõikes uuritava aine ja toksilisuse standardi kohta;

— LD_{50} kindlaksmääramiseks kasutatud statistilised menetlused;

— suremus kontrollrühmades;

— muu täheldatud või mõõdetud bioloogiline mõju, nt kõrvalekalded mesilaste käitumises (kaasaarvatud uuritavast doosist keeldumine), toidu tarbimise määr töödeldud ja töötlemata rühmades;

— mis tahes kõrvalekalle siinkirjeldatud katsemenetlustest ja muu oluline teave.

3. **VIITED**

1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151–165. March 1993.

2) Gough, H. J., Mclndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119–125.

3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99–113.

4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265–267.

▼B

C.17. **MESILASED – AKUUTSE KONTAKTTOKSILISUSE KATSE**

1. **MEETOD**

Käesolev akuutse toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 214 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev toksilisuse katse on laboratoorne meetod, mis on kavandatud taimekaitsetoodete ja teiste kemikaalide akuutse kontakttoksilisuse hindamiseks täiskasvanud töömesilastele.

Ainete toksiliste omaduste hindamisel võib nõuda akuutse kontakttoksilisuse kindlaksmääramist mesilaste puhul, st siis, kui on tõenäoline mesilaste kokkupuutumine antud kemikaaliga. Akuutse kontakttoksilisuse katse tehakse selleks, et kindlaks määrata pestitsiidide ja teiste kemikaalide toksilisus mesilastele. Käesoleva katse tulemusi tuleks kasutada edasise hindamise vajaduse määramiseks. Täpsemalt võib seda meetodit kasutada programmides, milles pestitsiidide poolt mesilastele tekitatud ohte hinnatakse astmeliselt ja mis põhinevad järjestikulisel üleminekul toksilisuse laboratoorsete katsete juurest poolväli- ja välikatseteni (1). Pestitsiide võib uurida nii toimeainetena kui ka valmististena.

Mesilaste tundlikkuse ja katsemenetluse täpsuse kindlakstegemiseks tuleks kasutada toksilisuse standardit.

1.2. MÕISTED

Akuutne kontakttoksilisus – negatiivne mõju, mis ilmneb hiljemalt 96 tunni jooksul pärast uuritava aine ühe doosi pealekandmist.

Doos – pealekantava uuritav aine kogus. Doosi väljendatakse uuritav aine massina (µg) katselooma kohta (µg/mesilane).

LD_{50} (letaalse doosi mediaan) kontakti korral – statistiliselt saadud aine ühekordne doos, mis võib kontaktmanustamisel põhjustada surma 50 % isenditest. LD_{50} väärtust väljendatakse uuritava aine mikrogrammides (µg) mesilase kohta. Pestitsiidide korral võib uuritav aine olla kas toimeaine või valmistis, milles on üks või mitu toimeainet.

Suremus – isend loetakse surnuks, kui see on täielikult liikumatu.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Täiskasvanud töömesilased *(Apis mellifera)* viiakse kokku sobivas kandeaines lahustatud uuritava aine erinevate doosidega, kandes need otse rindkerele (tilkadena). Katse kestus on 48 tundi. Kui suremuse määr suureneb 24 h ja 48 h vahel ning kui suremus kontrollrühmas jääb aktsepteeritavale tasemele, st < 10 %, on sobiv katse kestust pikendada maksimaalselt 96 tunnini. Suremust registreeritakse iga päev ja võrreldakse kontrollrühmas saadud väärtustega. Tulemused analüüsitakse, et arvutada välja LD_{50} väärtused 24. ja 48. tunni jaoks ja juhul, kui uuringut pikendatakse, siis ka 72. ja 96. tunni jaoks.

▼B

1.4. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

— keskmine suremus kõikides kontrollkatsetes kokku ei tohi katse lõpul ületada 10 %;

— toksilisuse standard LD_{50} vastab kõnealusele vahemikule.

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. **Mesilaste kogumine**

Kasutada tuleks sama tõugu noori töömesilasi, st mesilased peaksid olema samas vanuses, samamoodi toidetud, sama tõugu jne. Mesilased peaksid olema pärit piisavalt toidetud, tervetest ja võimalikult haigusvabamatest mesilasemaga kolooniatest, millel on tuntud ajalugu ja füsioloogiline staatus. Mesilased tuleks kokku koguda kasutamispäeva hommikul või katsele eelneval õhtul ja hoida katse tingimustes järgmise päevani. Sobivad on need mesilased, mis on kogutud raamidelt, millel ei ole pesakondi. Tuleks vältida kogumist varakevadel või hilissügisel, kuna mesilaste füsioloogia on sellel ajal muutunud. Kui katse tuleb teha varakevadel või hilissügisel, võib mesilastel lasta kooruda inkubaatoris ja neid võib kasvatada ühe nädala jooksul „mesilasleival" (kärjest kogutud õietolm) ja sahharoosilahusega. Toksilisuse katses ei tohiks kasutada mesilasi, keda on ravitud keemiliste ainetega, näiteks antibiootikumid, varroatoosivastased tooted jms, nelja nädala jooksul alates viimase ravimenetluse lõpust.

1.5.2. **Pidamis- ja söötmistingimused**

Kasutatakse kergesti puhastatavaid ja hästiventileeritud puure. Kasutada võib mis tahes materjalist, nt roostevabast terasest, traatvõrgust, plastmassist puure või ühekordselt kasutatavaid puupuure jms. Katsepuuride suurus peaks olema vastavauses mesilaste arvuga, st tagama piisava ruumi. Eelistatav mesilaste arv on kümme mesilast puuri kohta.

Mesilased tuleks hoida katseruumis pimedas temperatuuril 25 + 2 °C. Kogu uuringu jooksul tuleks registreerida suhteline õhuniiskus, mis normaalselt on ligikaudu 50–70 %. Käitlemismenetlusi, sealhulgas ainega töötlemist ja vaatlusi võib teha (päeva)valguses. Toiduks tuleks kasutada sahharoosi vesilahust, mille lõppkontsentratsioon on 500 g/l (50 massi-/mahuprotsenti) ja seda tuleks anda katse jooksul ad libitum, kasutades mesilaste toiteseadet. Selleks võib olla klaastoru (ligikaudu 50 mm pikk ja 10 mm läbimõõduga, mille avatud ots kitseneb kuni ligikaudu 2 millimeetrini).

1.5.3. **Mesilaste ettevalmistamine**

Pärast kogumist võib mesilased uuritava aine pealepanemiseks tuimestada süsinikdioksiidi või lämmastikuga. Kasutatava tuimasti kogus ja kokkupuuteaeg tuleks hoida minimaalsena. Surevaid mesilasi ei tuleks kasutada ja need asendatakse enne katse algust tervete mesilastega.

1.5.4. **Dooside ettevalmistamine**

Uuritav aine tuleb peale kanda kandeaines oleva lahusena, st orgaanilises lahustis või vesilahuses, mis sisaldab märgavat ainet. Orgaanilise lahustina eelistatakse atsetooni, kuid kasutada võib ka teisi mesilastele vähemürgiseid orgaanilisi lahusteid (nt dimetüülformamiidi, dimetüülsulfoksiidi). Vees dispergeeritud valmistitse ja orgaanilistes kandelahustites mittelahustuvate väga polaarsete orgaaniliste ainete lahuseid on lihtsam kasutada siis, kui need on valmistatud müügiloleva märgava aine (nt Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween) lahjas lahuses.

▼B

Valmistada tuleks sobivad kontroll-lahused, st kui kasutatakse lahustit või disperganti uuritava aine lahustamiseks, tuleks kasutada kahte iseseisvat kontrollrühma: üks, milles kasutatakse vett ja teine milles kasutatakse lahustit/disperganti.

1.6. KATSE KÄIK

1.6.1. **Katse- ja kontrollrühmad**

Dooside ja uuritud duplikaatide arv peaks vastama statistilistele nõuetele LD_{50} kindlaksmääramiseks 95 % usalduspiiriga. Tavaliselt nõutakse katse jaoks viit doosi geomeetrilises jadas, mille tegur ei ületa 2.2 ja mis katavad LD_{50} jaoks vajaliku vahemiku. Siiski tuleb dooside arv kindlaks määrata vastavalt toksilisuskõvera (doos *vs* suremus) tõusule ja tulemuste analüüsimiseks valitud statistilisele meetodile. Vahemiku kindlaksmääramise katse võimaldab valida välja sobivaid doose.

Iga uuritava kontsentratsiooniga lahust tuleks doseerida vähemalt kolmele dubleerivale katserühmale, milles igas on 10 mesilast.

Lisaks katseseeriale tuleks kasutada vähemalt kolme kontrollpartiid, milles igaühes on 10 mesilast. Kui kasutatakse orgaanilist lahustit või märgavat ainet, tuleb kasutada lahusti või märgava aine kohta kolme täiendavat kontrollpartiid, milles igaühes on 10 mesilast.

1.6.2. **Toksilisuse standard**

Katseseerias peab olema ka toksilisuse standard. Eeldatava LD_{50} väärtuse katmiseks tuleks valida vähemalt kolm doosi. Iga uuritavat doosi tuleks kasutada vähemalt kolme dubleeriva puuri korral, milles igaühes on 10 mesilast. Eelistatav toksilisuse standard on dimetoaat, mille kontaktse LD_{50} dokumenteeritud väärtus 24 tunni jaoks on vahemikus 0,10–0,30 µg toimeainet mesilase kohta (2). Siiski võib kasutada ka teisi toksilisuse standardeid juhul, kui on võimalik hankida piisavalt andmeid, et tõestada eeldatud reaktsiooni doosile (nt paratioon).

1.6.3. **Kokkupuude**

1.6.3.1. *Doseerimine*

Tuimestatud mesilastele kantakse uuritavat ainet peale individuaalselt. Mesilased määratakse juhuvaliku alusel erinevatele uuritavatele doosidele allutatavatesse rühmadesse ja kontrollrühmadesse. Iga mesilase rindkere selgmisele küljele määritakse peale mikroaplikaatoriga 1 µl uuritavat ainet sobivas kontsentratsioonis sisaldavat lahust. Kasutada võib ka muid koguseid, kui see on õigustatud. Pärast pealekandmist jagatakse mesilased katsepuuridesse ja neile antakse sahharoosilahust.

1.6.3.2. *Kestus*

Katse kestus on eelistatavalt 48 tundi. Kui suremus tõuseb 24 ja 48 tunni vahel rohkem kui 10 %, tuleks katse kestust pikendada maksimaalselt 96 tunnini eeldusel, et suremus kontrollrühmas ei ületa 10 %.

▼B

1.6.4. **Vaatlused**

Suremus registreeritakse 4. tunnil pärast doseerimist ja seejärel 24. ja 48. tunnil. Kui osutub vajalikuks vaatlusperioodi pikendada, tuleks teha edasisi hindamisi 24tunniste vahedega kuni 96. tunnini eeldusel, et suremus kontrollrühmas ei ületa 10 %.

Kõik katseperioodi jooksul tuvastatud kõrvalekalded käitumises tuleks registreerida.

1.6.5. **Piirsisalduskatse**

Teatud juhtudel (nt kui eeldatakse, et uuritav aine on madala toksilisusega) tuleks teha piirsisalduskatse, kasutades 100 µg toimeainet mesilase kohta, eesmärgiga näidata, et LD_{50} on sellest väärtusest suurem. Tuleks kasutada sama menetlust, st seal peaks olema kolm dubleerivat katserühma uuritava doosi kohta, asjaomased kontrollkatsed ning toksilisuse standardi kasutamine. Kui esineb suremust, tuleks teha täielik uuring. Kui täheldatakse subletaalseid mõjusid (vt punkti 1.6.4), tuleks need registreerida.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

2.1. ANDMED

Andmed tuleks kokku võtta tabelina, näidates ära iga menetlusrühma, kontrollrühma ja toksilisuse standardi rühma kohta kasutatud mesilaste arvu, suremuse iga vaatlusaja kohta ja ebatavalise käitumisega mesilaste arvu. Suremuse andmeid tuleks analüüsida sobiva statistilise meetodiga (nt probitanalüüs, libisev keskväärtus, binomiaalne tõenäosus) (3, 4). Sõltuvuse doos-reaktsioon koostatakse iga soovitatava vaatlusaja (st 24. h, 48. h ja kui kasutatakse, siis ka 72. h ja 96. h) kohta ja arvutatakse kõverate tõusud ning letaalse doosi mediaanid (LD_{50}) 95 % usalduspiiri jaoks. Kontrollrühma suremust võib korrigeerida, kasutades Abbotti korrigeerimist (4, 5). LD_{50} tuleks avaldada uuritava aine µg-des mesilase kohta.

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. **Uuritav aine:**

— füüsikaline loomus ning füüsikalis-keemilised omadused (nt püsivus vees, aururõhk);

— keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas struktuurivalem, puhtus (st pestitsiidide korral toimeaine(te) loomus ja kontsentratsioon).

2.2.2. **Katsealused liigid:**

— teaduslik nimi, tõug, ligikaudne vanus (nädalates), kogumismeetod, kogumise kuupäev;

— teave katsemesilaste kogumiseks kasutatud kolooniate kohta, sealhulgas nende tervisliku seisundi, täiskasvanud isendite haiguste, eelneva ravi jms kohta.

▼B

2.2.3. **Katsetingimused:**

— katseruumi temperatuur ja suhteline õhuniiskus;

— pidamistingimused, sealhulgas puuride tüüp, suurus ja materjal;

— uuritava aine manustamise meetodid, nt kasutatud kandelahus, pealekantud uuritava lahuse ruumala, kasutatud tuimasti;

— katse kavandamine, nt kasutatud uuritavad doosid ja nende arv, kontrollkatsete arv; iga uuritava doosi ja kontrollrühma kohta dubleerivate puuride arv ja mesilaste arv puuri kohta;

— katse kuupäev.

2.2.4. **Tulemused:**

— kui tehakse esialgse vahemiku leidmise uuring, siis selle tulemused;

— lähteandmed: suremus iga uuritud kontsentratsiooni kohta igal vaatlushetkel;

— doosi-reaktsiooni sõltuvuse graafik katse lõpus;

— LD_{50} väärtused 95 % usalduspiiriga iga soovitatava vaatlushetke lõikes uuritava aine ja toksilisuse standardi kohta;

— LD_{50} kindlaksmääramiseks kasutatud statistilised menetlused;

— suremus kontrollrühmades;

— muu täheldatud või mõõdetud bioloogiline mõju ja mesilaste mis tahes ebatavalised reaktsioonid;

— mis tahes kõrvalekalded siinkirjeldatud katsemeetodi menetlustest ja muu oluline teave.

3. **VIITED**

1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151–165. March 1993.

2) Gough, H. J., Mclndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.), 1981–1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99–113.

4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265–267.

▼B

C.18. ADSORPTSIOON/DESORPTSIOON, KASUTADES PARTII TASAKAALUSTAMISE MEETODIT

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub OECD juhendist TG 106 mulla adsorptsiooni/desorptsiooni määramiseks, kasutades partii tasakaalustamise meetodit (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev meetod võtab arvesse nii laboritevahelist võrdlust, adsorptsioonikatse tegemise jaoks mulla valikut puudutavat seminari (1, 2, 3, 4) kui ka riiklikul tasandil olemasolevaid juhiseid (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Adsorptsiooni-/desorptsiooniuuringutest saadakse vajalikku teavet kemikaalide liikuvuse ja jaotumise kohta biosfääri maa-, vee- ja õhukihtides (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21). Seda teavet võib kasutada näiteks selleks, et prognoosida või hinnata kemikaalide lagunemist (22, 23), muundumist või organismide poolt omastamist (24), leostumist läbi mullakihtide (16, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 28), lenduvust mullast (21, 29, 30) või uhtumist maapinnalt looduslikku vette (18, 31, 32). Adsorptsiooni puudutavaid andmeid võib kasutada võrdlemiseks ja modelleerimiseks (19, 33, 34, 35).

Kemikaali jagunemine mulla- ja vesifaasi vahel on keeruline protsess, mis sõltub paljudest erinevatest teguritest: aine keemilisest iseloomust (12, 36, 37, 38, 39, 40), mulla omadustest (4, 12, 13, 14, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49) ja kliimateguritest, nagu näiteks sademed, temperatuur, päikesevalgus ja tuul. Seega ei saa kemikaali mullal toimuva adsorptsiooniprotsessiga seotud paljusid erinevaid nähtusi ja mehhanisme täielikult määratleda lihtsustatud laboratoorse mudeli, näiteks käesoleva meetodi abil. Olenemata sellest, et käesoleva meetodiga ei ole võimalik katta kõiki keskkonnas võimalikke juhtusid, annab see siiski väärtuslikku teavet kemikaali adsorptsiooni olulisuse kohta keskkonnale.

Vt ka üldist sissejuhatust.

1.2. REGULEERIMISALA

Selle meetodi eesmärk on kindlaks määrata kemikaalide adsorptsioon/desorptsioon mullas. Eesmärk on saada sorptsiooniväärtus, mida saab kasutada jaotumuse prognoosimiseks erinevates keskkonnatingimustes; selleks määratakse kindlaks kemikaali tasakaalulised adsorptsioonitegurid erinevatele muldadele mullaomaduste funktsioonina (nt orgaanilise süsiniku sisaldus, savisisaldus, mullastruktuur ja pH). Võimalikult laia konkreetse aine ja looduslike muldade vastastikuse mõju hõlmamiseks tuleb kasutada erinevaid mullatüüpe.

Käesolevas meetodis tähendab adsorptsioon kemikaali kinnitumisprotsessi mulla pinnale; selles ei eristata erinevaid adsorptsiooniprotsesse (füüsikaline ja keemiline adsorptsioon) ega selliseid protsesse nagu pindkatalüseeritud lagunemine, koguadsorptsioon või keemiline reaktsioon. Mulla tekitatud kolloidosakestes (läbimõõduga < 0,2 μm) toimunud adsorptsiooni ei võeta arvesse.

▼B

Mullaparameetrid, mida peetakse adsorptsiooni puhul kõige tähtsamateks, on: orgaanilise süsiniku sisaldus (3, 4, 12, 13, 14, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48), savisisaldus ja mullastruktuur (3, 4, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48) ning pH ioniseerivate ühendite jaoks (3, 4, 42). Muud mulla parameetrid, mis võivad mõjutada konkreetse aine adsorptsiooni/desorptsiooni, on efektiivne katioonide neelamismahutavus (ECEC), amorfse raua ja alumiiniumoksiidide sisaldus, eriti vulkaaniliste ja troopiliste muldade puhul (4), ja samuti eripindala (49).

Katse eesmärk on määrata kemikaali adsorptsioon erinevates mullatüüpides, millel on erinev orgaanilise süsiniku sisaldus, savisisaldus, mullastruktuur ja pH. See koosneb kolmest tasemest:

1. tase: eelkatse, et teha kindlaks:

— mulla/lahuse suhe:

— adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise aeg ja adsorbeerunud uuritava aine kogus tasakaaluolekus;

— uuritava aine adsorbeerumine katseanumate pindadel ja uuritava aine püsivus katseperioodi jooksul.

2. tase: sõeluuring: adsorptsiooni uuritakse viie erineva mullatüübi puhul, kasutades adsorptsioonikineetikat ühel kontsentratsioonil ja määrates jaotustegurid K_d ja K_{oc}.

3. tase: Freundlichi adsorptsiooniisotermide määramine, et oleks võimalik määrata kontsentratsiooni mõju mullas toimuva adsorptsiooni ulatusele.

Desorptsiooniuuring, kasutades desorptsioonikineetikat/Freundlichi desorptsiooniisoterme (1. liide).

1.3. MÕISTED JA ÜHIKUD

Tähis	Mõiste	Ühikud
A_{t_i}	adsorptsiooniprotsent ajahetkel t_i	%
A_{eq}	adsorptsiooniprotsent adsorptsiooni tasakaaluolekus	%
$m_s^{ads}(t_i)$	mullal adsorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	mullal adsorbeerunud uuritava aine mass ajavahemikus Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	mullal adsorbeerunud uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	µg
m_0	uuritava aine mass katseklaasis adsorptsioonikatse alguses	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	uuritava aine mass, mõõdetud alikvoodis (v_a^A) ajahetkel t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus	µg
m_{soil}	mullafaasi kogus, väljendatud mulla kuivmassina	g

▼B

Tähis	Mõiste	Ühikud
C_{st}	aine põhilahuse mas sikontsentratsioon	µg cm^{-3}
C_0	mullaga kokkupuutuva katselahuse esialgne massikontsentratsioon	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	aine massikontsentratsioon vesifaasis analüüsi tegemise ajahetkel t_i	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	mullal adsorbeerunud aine sisaldus adsorptsiooni tasakaaluolekus	µg cm^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	aine massikontsentratsioon vesifaasis adsorptsiooni tasakaaluolekus	µg cm^{-3}
V_0	adsorptsioonikatse jooksul mullaga kokkupuutuva vesifaasi esialgne ruumala	cm^3
v_a^A	alikvoodi ruumala, milles uuritavat ainet mõõdetakse	cm^3
K_d	adsorptsiooni jaotustegur	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	orgaanilise süsiniku suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur	cm^3 g^{-1}
K_{om}	orgaanilise ainese suhtes normaliseeritud jaotustegur	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freundlichi adsorptsioonitegur	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freundlichi eksponent	
D_{t_i}	desorptsiooniprotsent ajahetkel t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorptsiooniprotsent, mis vastab ajavahemikule Δt_i	%
K_{des}	ilmne desorptsioonitegur	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlichi desorptsioonitegur	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	mullast desorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i	µg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	mullast ajavahemikus Δt_i desorbeerunud uuritava aine mass	µg
$m_m^{des}(eq)$	aine analüütiliselt määratud mass vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	desorbeerunud uuritava aine kogumass desorptsiooni tasakaaluolekus	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	aine mass, mis jääb mullale adsorbeerununa pärast ajavahemiku Δt_i möödumist	µg
m_{aq}^A	osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	µg
$C_s^{des}(eq)$	mullale jääv adsorbeerunud uuritava aine sisaldus desorptsiooni tasakaaluolekus	µg g^{-1}

▼B

Tähis	Mõiste	Ühikud
$C_{aq}^{des}(eq)$	uuritava aine massikontsentratsioon vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus	µg cm^{-3}
V_T	desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga mullaga kokku puutuva vesifaasi koguruumala	cm^3
V_R	adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M $CaCl_2$ lahusega	cm^3
v_a^D	desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga analüütilisel eesmärgil ajahetkel (i) võetud alikvoodi ruumala	cm^3
$V_{ra}i^D$	uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist (i) võetud lahuse desorptsioonikineetika ruumala (paralleelmeetod)	cm^3
V_r^F	uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist võetud lahuse ruumala desorptsiooni tasakaaluolekus	cm^3
MB	massitasakaal	%
m_E	mullast ja katseanuma seintelt kahes etapis ekstraheeritud uuritava aine kogumass	µg
V_{rec}	adsorptsiooni tasakaaluoleku järel regenereeritud supernatandi ruumala	cm^3
P_{ow}	jaotustegur oktanool/vesi	
pKa	dissotsiatsioonikonstant	
S_w	lahustuvus vees	g l^{-1}

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritava aine lahuste teadaolevad ruumalad, märgistamata või radiomärgistatud, teadaolevate kontsentratsioonidena 0,01 M $CaCl_2$-s lisatakse teadaoleva kuivmassiga mullaproovidele, mis on eeltasakaalustatud 0,01 M $CaCl_2$-s. Segu segatakse piisava aja jooksul. Seejärel eraldatakse mullasuspensioonid tsentrifuugimise ja soovi korral filtreerimise teel ning analüüsitakse vesifaasi. Mullaproovile adsorbeerunud uuritava aine kogus arvutatakse algselt lahuses esinenud uuritava aine koguse ja katse lõpus järelejäänud uuritava aine koguse vahena (kaudne meetod).

Alternatiivina võib adsorbeerunud uuritava aine koguse määrata ka otse mullaanalüüsi teel (otsene meetod). Menetlust, mis sisaldab mulla astmelist eraldamist sobiva lahustiga, soovitatakse siis, kui aine kontsentratsiooni vahet lahuses ei ole võimalik täpselt määrata. Sellised juhud on näiteks: uuritava aine adsorptsioon katseanuma pinnale, uuritava aine ebastabiilsus katse tegemise jooksul, nõrk adsorptsioon, mis põhjustab lahuses vaid väikese kontsentratsioonimuutuse; ja tugev adsorptsioon, mis põhjustab madala kontsentratsiooni, mida ei ole võimalik täpselt määrata. Radiomärgistatud aine kasutamisel võib mulla eraldamise ära jätta, kui tehakse mullafaasi analüüs, kasutades põlemist ja vedelikstsintillatsiooniloendust. Vedelikstsintillatsiooniloendus on siiski mittespetsiifiline tehnika, millega ei saa teha vahet lähteainetel ja muundatud toodetel, seepärast tuleks seda kasutada ainult siis, kui uuritav aine on püsiv kogu uuringu jooksul.

▼B

1.5. TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Keemilised reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Soovitatakse kasutada märgistamata uuritavaid aineid, mille koostis on teada ja mille puhtusaste on eelistatavalt vähemalt 95 %, või radiomärgistatud uuritavaid aineid, mille koostis ja radioaktiivsete isotoopide puhtusaste on teada. Kui märgistusainete poolestusaeg on lühike, tuleks kohaldada lagunemise korrigeerimist.

Enne adsorptsiooni-desorptsioonikatse tegemist peab uuritava aine kohta olema kättesaadav järgmine teave:

a) lahustuvus vees (A.6);

b) aururõhk (A.4) ja/või Henry konstant;

c) abiootiline lagunemine: hüdrolüüs pH funktsioonina (C.7);

d) jaotustegur (A.8);

e) kiire biolagunduvus (C.4) või aeroobne ja anaeroobne muundumine mullas;

f) ioniseerivate ainete pKa;

g) otsene fotolüüs vees (st UV-Vis absorptsioonispekter vees, kvantsaagis) ja fotodegradatsioon mullas.

1.6. KATSE KASUTATAVUS

Katset kasutatakse keemiliste ainete puhul, mille kohta on olemas piisava täpsusega analüüsimeetod. Uuritava aine püsivus katse jooksul on tähtis parameeter, mis võib mõjutada tulemuste usaldatavust, eriti kui kasutatakse kaudset meetodit. Seega tuleb aine püsivust kontrollida eeluuringuga; kui katse tegemise jooksul tuvastatakse muundumine, soovitatakse põhiuuringu tegemiseks kasutada nii mulla- kui ka vesifaasi analüüsi.

Raskused võivad tekkida siis, kui katse tegemisel kasutatakse madala veeslahustuvusega uuritavaid aineid ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) või suure laenguga aineid, kuna kontsentratsiooni vesifaasis ei ole võimalik analüütiliselt mõõta piisava täpsusega. Sellisel juhul tuleb võtta lisameetmeid. Juhised selliste probleemide korral käitumiseks esitatakse käesoleva meetodi asjakohastes jagudes.

Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleb hoolitseda selle eest, et uuringu jooksul ei tekiks kadusid.

1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.7.1. **Seadmed ja keemilised reaktiivid**

Harilik laboratooriumivarustus, eelkõige järgmine.

a) Katseklaasid või anumad katsete tegemiseks. On oluline, et katseklaasid või anumad:

— sobiksid vahetult tsentrifuugi, et minimeerida käitlemisest ja ümberpaigutamisest tuleneda võivaid vigu;

— oleksid tehtud inertsest materjalist, mis muudab uuritava aine adsorbeerumise nende pinnal minimaalseks.

▼B

b) Raputi: rippraputi või samalaadne seade; raputi peab raputamise ajal hoidma mulda suspensioonis.

c) Tsentrifuug: eelistatavalt suure kiirusega, nt tsentrifugaaljõuga > 3 000 g, reguleeritava temperatuuriga, võimeline eemaldama vesilahusest osakesi, mille läbimõõt on suurem kui 0,2 μm. Konteinerid peavad raputamise ja tsentrifuugimise jooksul olema suletud, et vältida ainete lenduvust ja veekadu; korkidele tekkiva adsorbeerumise minimeerimiseks tuleb kasutada deaktiveeritud korke, näiteks Teflon®iga kaetud keeratavad korgid.

d) Pole kohustuslik: filtreerimisseade; poorsusega 0,2 μm, steriilsed ja ühekordselt kasutatavad filtrid. Eriti tähelepanelikult tuleks valida filtri materjal, et vältida uuritava aine kadu sellesse; nõrgalt lahustuvate uuritavate ainete korral ei soovitata kasutada orgaanilist filtrimaterjali.

e) Analüüsivahendid, mis sobivad uuritava kemikaali kontsentratsiooni mõõtmiseks.

f) Laboratooriumiahi, mis on suuteline säilitama temperatuuri 103–110 °C.

1.7.2. **Mulla iseloomustamine ja valik**

Mulda tuleks iseloomustada kolme parameetri abil, mida peetakse enamasti vastutavaks adsorptsioonimahtuvuse eest: orgaaniline süsinik, savisisaldus ja mullastruktuur ning pH. Nagu juba nimetatud (vt „Reguleerimisala”), võivad ka muud mulla füüsikalis-keemilised omadused mõjutada konkreetse aine adsorptsiooni/desorptsiooni ja neid tuleks sellisel juhul arvestada.

Mulla iseloomustamisel on kasutatavad meetodid väga olulised ja need võivad tulemusi märkimisväärselt mõjutada. Seetõttu soovitatakse mulla pH-d mõõta 0,01 M $CaCl_2$ lahuses (st lahuses, mida kasutatakse adsorptsiooni-/desorptsioonikatses) vastava ISO meetodi (ISO-10390-1) kohaselt. Samuti soovitatakse teised olulised mulla omadused määrata vastavalt standardmeetoditele (nt ISO „Handbook of Soil Analysis”); see võimaldab kasutada sorptsiooniandmete analüüsi, tuginedes ülemaailmselt standarditud mullaparameetritele. Mõned olemasolevate mulla analüüsimise ja iseloomustamise standardmeetodite juhised on esitatud viidetes (50–52). Mulla katsemeetodite kaliibrimiseks soovitatakse kasutada võrdlusmulda.

Juhised muldade valimiseks adsorptsiooni-/desorptsioonikatsete jaoks esitatakse tabelis 1. Seitse väljavalitud mulda hõlmavad erinevaid parasvöötme mullatüüpe. Ioniseeruvate uuritavate ainete jaoks peavad väljavalitud mullad hõlmama laia pH vahemikku, et oleks võimalik hinnata aine adsorptsiooni ioniseeritud ja ioniseerimata vormides. Juhised selle kohta, mitut erinevat mulda katse erinevates etappides kasutada, on esitatud punktis 1.9 „Katse käik”.

Kui eelistatakse teisi mullatüüpe, tuleks neid iseloomustada samade parameetritega ja neil peaks olema samalaadne omaduste varieeruvus nagu tabelis 1 kirjeldatud tüüpidel, isegi kui need ei vasta täpselt kriteeriumidele.

▼B

Tabel 1

Juhised mullaproovide valimiseks adsorptsiooni-desorptsiooni jaoks

Mullatüüp	pH-vahemik (0,01 M $CaCl_2$ lahuses)	Orgaanilise süsiniku sisaldus (%)	Savisisaldus (%)	Mulla struktuur [1]
1	4,5–015,5	1,0–2,0	65–80	savi
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	gleistunud saviliiv
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	ladestunud saviliiv
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	saviliiv
5	< 4,0–6,0 [2]	< 0,5–1,5 [2], [3]	< 10–15 [2]	saviliivane liiv
6	> 7,0	< 0,5–1,0 [2], [3]	40–65	gleistunud saviliiv/savi
7	< 4,5	> 10	< 10	liiv/saviliivane liiv

[1] Vastavalt FAO ja US süsteemile (85).
[2] Vastavad muutujad peaksid eelistatavalt jääma esitatud vahemikku. Kui sobivat mullamaterjali on siiski raske leida, aktsepteeritakse ka märgitud miinimumist väiksemaid väärtusi.
[3] Mullad, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on alla 0,3 %, võivad häirida orgaanilise aine sisalduse ja adsorptsiooni vahelist korrelatsiooni. Seetõttu on soovitatav kasutada muldasid, mille minimaalne orgaanilise süsiniku sisaldus on 0,3 %.

1.7.3. **Mullaproovide kogumine ja ladustamine**

1.7.3.1. *Kogumine*

Ei soovitata mingeid konkreetseid proovivõtmise tehnikaid ega vahendeid; proovivõtmise tehnika sõltub uuringu eesmärgist (53, 54, 55, 56, 57, 58).

Arvestada tuleks järgmist:

a) vajalik on üksikasjalik teave väliplatsi ajaloo kohta; see sisaldab asukohta, taimkatet, pestitsiidide ja/või väetiste kasutamist, bioloogilisi lisandeid või juhuslikku reostust. Tuleks järgida ISO standardi soovitusi mullaproovide võtmiseks (ISO 10381-6) vastavalt proovivõtmise ala kirjeldusele;

b) proovivõtukohta tuleb määratleda vastavalt UTM-ile (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) või geograafilistele koordinaatidele; see võimaldab tulevikus konkreetset mulda uuesti koguda või aidata määratleda mulda erinevates riikides kasutatavate erinevate klassifitseerimissüsteemide alusel. Samuti tuleks koguda ainult A-kihist kuni 20 cm sügavuselt. Eriti mullatüübi nr 7 korral, kui mullas esineb O_h-kiht, tuleks see lisada proovile.

Mullaproovid tuleks transportida konteinerites ja sellistel temperatuuritingimustel, mis tagavad, et mulla esialgsed omadused märkimisväärselt ei muutu.

▼B

1.7.3.2. *Ladustamine*

Eelistatakse mulda, mis on värskelt proovivõtualalt võetud. Ainult siis, kui see ei ole võimalik, võib mulda ladustada toatemperatuuril ja seda tuleks hoida õhukuivana. Ladustamisaega ei piirata, kuid üle kolme aasta ladustatud mulda tuleks enne kasutamist uuesti analüüsida orgaanilise süsiniku sisalduse, pH ja katioonide neelamismahutavuse (CEC) suhtes.

1.7.3.3. *Mullaproovide käitlemine ja ettevalmistamine uuringuks*

Muld kuivatatakse õhu käes toatemperatuuril (eelistatavalt vahemikus 20–25 °C). Kogused tuleks jaotada võimalikult ettevaatlikult, nii et mulla struktuur muutuks nii vähe kui võimalik. Muld sõelutakse kuni osakeste suuruseni $\leq$ 2 mm; sõelumisprotsessi puhul tuleks järgida ISO standardi soovitusi mullaproovide võtmiseks (ISO 10381-6). Soovitatakse hoolikat homogeenimist, sest see suurendab tulemuste reprodutseeritavust. Iga mulla niiskusesisaldus määratakse kindlaks kolme alikvoodiga, mida kuumutatakse temperatuuril 105 °C, kuni märgatavat massimuutust enam ei esine (ligikaudu 12 tundi). Kõikide arvutuste puhul tähendab mulla mass ahjukuiva massi, st mulla massi, mis on korrigeeritud niiskusesisaldusega.

1.7.4. **Uuritava aine mullale lisamiseks ettevalmistamine**

Uuritav aine lahustatakse 0,01 M $CaCl_2$ destilleeritud või deioniseeritud vee lahuses; $CaCl_2$ lahust kasutatakse kui vesilahuse faasi, et parandada tsentrifuugimist ja minimeerida katioonide neelamist. Põhilahuse kontsentratsioon peaks eelistatavalt olema kolm suurusjärku kõrgem kui kasutatava analüüsimeetodi avastamispiir. See lävi kaitseb mõõtmise täpsust vastavalt käesolevas meetodis kasutatavale metoodikale; lisaks sellele peaks põhilahuse kontsentratsioon olema allpool uuritava aine lahustuvuse piiri vees.

Põhilahus tuleks eelistatavalt ette valmistada vahetult enne selle lisamist mullaproovidele ja seda tuleks hoida suletuna pimedas temperatuuril 4 °C. Hoiuaeg sõltub uuritava aine püsivusest ja selle kontsentratsioonist lahuses.

Ainult halvasti lahustuvate ainete puhul ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) võib osutuda vajalikuks kasutada sobivat solubiliseerivat ainet, kui uuritavat ainet on raske lahustada. See solubiliseeriv aine: a) peaks segunema veega, nagu näiteks metanool või atsetonitriil; b) selle kontsentratsioon ei tohiks ületada 1 % põhilahuse koguruumalast ja peaks moodustama alla selle määra uuritava aine lahuses, mis puutub kokku mullaga (eelistatavalt alla 0,1 %); ja c) ei tohiks olla pindaktiivne aine ega osaleda solvolüüsis uuritavate kemikaalidega. Solubiliseeriva aine kasutamine tuleks sätestada ja uuringuaruandes ära põhjendada.

Teine võimalus halvasti lahustuvate ainete jaoks on uuritava aine lisamine uuritavasse süsteemi süstitavate portsjonite kaupa: uuritav aine lahustatakse orgaanilises lahustis, selle alikvoot lisatakse mullast ja 0,01 M $CaCl_2$ lahusest destilleeritud või deioniseeritud veest koosnevasse süsteemi. Orgaanilise lahusti sisaldus vesifaasis tuleks hoida võimalikult madalal, tavaliselt mitte üle 0,1 %. Spaikimine orgaanilisest lahusest võib mõjutada negatiivselt mahu reprodutseeritavust. Seega on võimalik täiendava vea esinemine, kui uuritava aine ja kaaslahusti kontsentratsioonid ei ole samad kõikides katsetes.

▼B

1.8. ADSORPTSIOONI-/DESORPTSIOONIKATSE TEGEMISE EELDUSED'

1.8.1. **Analüüsimeetod**

Kõige tähtsamad parameetrid, mis võivad mõjutada sorptsiooni määramise täpsust, on nii lahuse-kui adsorptsioonifaaside analüüsimisel kasutatava analüüsimeetodi täpsus, uuritava aine püsivus ja puhtus, sorptsiooni tasakaaluoleku püstitumine, lahuse kontsentratsioonimuutuse suurus, mulla/lahuse suhe ja muutused mulla struktuuris tasakaaluprotsessi jooksul (35, 59–62). 2. liites esitatakse mõningad näited täpsust puudutavate küsimuste kohta.

Kasutatud analüüsimeetodi usaldusväärsust tuleb kontrollida sellises kontsentratsioonivahemikus, mis võib tõenäoliselt esineda uuringu käigus. Uuringu läbiviija võib vabalt välja töötada sobiva meetodi koos asjakohase täpsuse, kordustäpsuse, reprodutseeritavuse, avastamispiiride ja regenereeritavusega. Juhised sellise uuringu tegemiseks antakse allpool kirjeldatud katsega.

Sobiv ruumala 0,01 M $CaCl_2$ lahust, nt 100 cm^3, segatakse 4 tunni jooksul mulla kogusega (nt 20 g), mille adsorptsioonivõime on kõrge, st millel on kõrge süsiniku- ja savisisaldus; need kogused ja ruumalad võivad varieeruda sõltuvalt analüüsi tingimustest, kuid alguspunktiks on sobiv mulla/lahuse suhe 1:5. Segu tsentrifuugitakse ja vesifaasi võib filtreerida. Viimasele lisatakse teatav ruumala uuritava aine põhilahust, et saavutada nominaalne kontsentratsioon selles kontsentratsioonivahemikus, mis võib katse käigus tõenäoliselt esineda. See ruumala ei tohiks olla suurem kui 10 % vesifaasi lõplikust ruumalast, et võimalikult vähem muuta tasakaaluolekueelse lahuse omadusi. Lahust analüüsitakse.

Tuleb teha ka üks pimekatse ainult mulla ja $CaCl_2$ lahusega (ilma uuritava aineta), et oleks võimalik kontrollida analüüsimeetodist tulenevaid artefakte ja pinnasest põhjustatud maatriksefekte.

Analüüsimeetodid, mida võib kasutada sorptsiooni määramiseks, on gaasikromatograafia (GLC), kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC), spektromeetria (nt GC/massispektromeetria, HPLC/massispektromeetria) ja vedelikstsintillatsiooniloendus (radiomärgistatud ainete puhul). Kasutatavast analüüsimeetodist sõltumata loetakse sobivaks, kui taastumine jääb vahemikku 90–110 % nominaalväärtusest. Selleks, et võimaldada pärast jaotamist tulemust kindlaks määrata ja hinnata, peavad analüüsimeetodi avastamispiirid olema vähemalt kaks suurusjärku allpool nominaalset kontsentratsiooni.

Adsorptsiooniuuringute tegemisel kasutatava analüüsimeetodi omadustel ja avastamispiiridel on katsetingimuste kindlaksmääramisel oluline roll ja need mõjutavad kogu katse tulemusi. Kõnealuse meetodiga järgitakse üldiseid katsete tegemise reegleid ja sellega antakse soovitused ning juhtnöörid alternatiivsete lahenduste jaoks, kui analüüsimeetod ja laboratoorsed võimalused jäävad kitsaks.

▼B

1.8.2. **Optimaalsete mulla/lahuse suhete valimine**

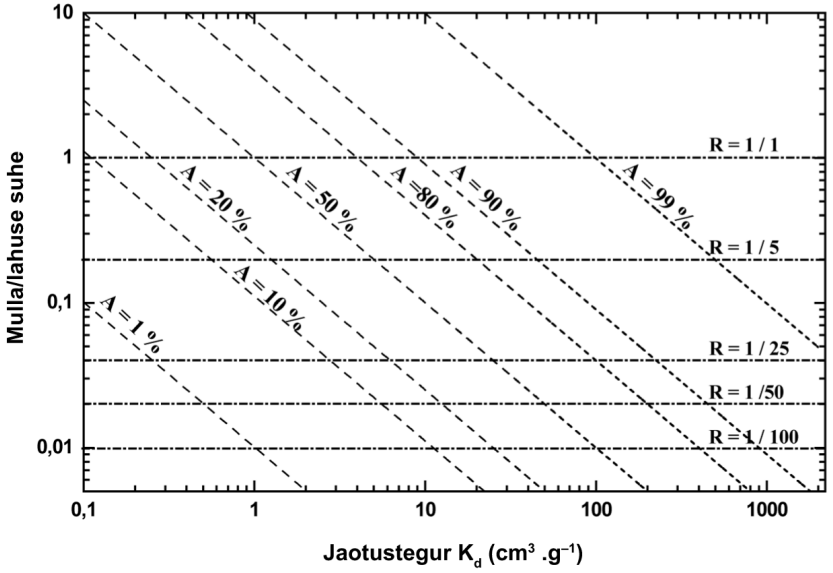
Sobivate mulla/lahuse suhete valik sorptsiooniuuringute jaoks sõltub jaotustegurist K_d ja soovitavast suhtelisest adsorptsioonimäärast. Aine kontsentratsiooni muutus lahuses määrab ära adsorptsiooni võrrandil põhinevate määramiste statistilise täpsuse ja analüüsimeetodi piiri kemikaali kindlaksmääramisel lahuses. Seetõttu on üldises praktikas kasulik keskenduda mõnele fikseeritud suhtele, mille puhul adsorbeerumise protsent on üle 20 % ja soovitatavalt > 50 % (62), hoolitsedes samal ajal selle eest, et uuritava aine kontsentratsioon vesifaasis oleks selle täpseks määramiseks piisavalt kõrge. See on eriti oluline siis, kui adsorptsiooniprotsent on kõrge.

Otstarbekas lähenemine sobivate mulla/vee suhete valimiseks põhineb K_d väärtuse hindamisel kas eeluuringute käigus või kindlaksmääratud hindamistehnikate abil (3. liide). Seega võib sobiva suhte valimine põhineda K_d funktsioonina esitatud mulla/lahuse suhte graafiku põhjal fikseeritud adsorptsiooniprotsentidel (joonis 1). Selles graafikus eeldatakse, et adsorptsioonivõrrand on lineaarne. ([1]) Kasutatav sõltuvus saadakse K_d avaldise (4) teisendamisel võrrandi (1) vormi:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

Või selle logaritmilisse vormi eeldades, et $R = m_{soil}/V_0$ ja $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{1 - (A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$



Joonis 1. Mulla/lahuse suhete ja K_d vaheline suhe uuritava aine erinevate adsorptsiooniprotsentide juures.

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

Joonisel 1 esitatakse vajalikud mulla/lahuse suhted K_d funktsioonina erinevate adsorptsiooniastmete jaoks. Näiteks kui mulla/lahuse suhe on 1:5 ja K_d on 20, esineb ligikaudu 80 %ne adsorptsioon. Selleks, et sama K_d korral saada 50 %st adsorptsiooni, tuleb kasutada suhet 1:25. Käesolev lähenemisviis sobivate mulla/lahuse suhete valimiseks võimaldab uurijal paindlikult eksperimendi vajadustega arvestada.

Raskemini käsitletavad olukorrad on sellised, kus kemikaali adsorptsioon on väga tugev või nõrk. Madala adsorptsiooni korral on soovitatav kasutada mulla ja lahuse vahekorda 1:1, kuigi mõnede väga orgaanilist tüüpi muldade puhul võib suspensiooni saamiseks osutuda vajalikuks väiksem suhe. Lahuses väikeste kontsentratsioonimuutuste määramiseks kasutatava analüüsimeetodi korral tuleb olla ettevaatlik, vastasel korral võib adsorptsiooni määramine olla ebatäpne. Teisest küljest, kui jaotustegurid K_d on väga kõrged, võib mulla/lahuse suhe tõusta kuni 1:100, et lahusesse jääks märkimisväärne kogus kemikaali. Siiski tuleb hoolitseda korraliku segamise eest ning süsteemile tuleb tasakaalu püstitumiseks anda piisavalt aega. Alternatiivseks lähenemiseks selliste ekstreemsete juhtudega tegelemisel, kui sobiv analüüsimeetod puudub, on prognoosida Kd väärtus, kasutades selliseid hindamistehnikaid, mis põhinevad näiteks P_{ow} väärtustel (3. liide). See võiks olla eriti kasulik nõrgalt adsorbeeruvate/polaarsete kemikaalide korral, mille $P_{ow} < 20$, ja lipofiilsete/väga sorbeeruvate kemikaalide korral, mille $P_{ow} > 104$.

1.9. KATSE KÄIK

1.9.1. **Katsetingimused**

Kõik katsed tehakse toatemperatuuril ja võimaluse korral konstantse temperatuuri juures, mis jääb vahemikku 20–25 °C.

Tsentrifuugimisega peaks olema võimalik eraldada lahusest suuremad kui 0,2 μm suurused osakesed. Selle väärtusega tähistatakse väikseimat tahke osakese suurust ja see on piirväärtuseks tahkete ja kolloidosakeste vahel. Tsentrifuugimise tingimuste kindlaksmääramise juhised esitatakse 4. liites.

Kui tsentrifuugimisega ei ole võimalik tagada suuremate kui 0,2 μm suuruste osakeste eraldamist, tuleks kasutada tsentrifuugimise ja 0,2 μm suurusega filtreid kasutava filtreerimise kombinatsiooni. Need filtrid peaksid olema tehtud sobivast inertsest materjalist, et vältida uuritava aine kadu nendesse. Igal juhul tuleks tõestada, et filtreerimise jooksul ei esine uuritava aine kadu.

1.9.2. **1. tase – eeluuring**

Eeluuringu eesmärk on esitatud jaos „Reguleerimisala”. Juhised sellise uuringu ettevalmistamiseks esitatakse allpool kirjeldatud katsega.

1.9.2.1. *Optimaalsete mulla/lahuse suhete valimine*

Kasutatakse kahte mullatüüpi ja kolme mulla/lahuse suhet (kuus katset). Ühel mullatüübil on kõrge orgaanilise süsiniku sisaldus ja madal savisisaldus ning teisel on madal orgaanilise süsiniku sisaldus ja kõrge savisisaldus. Soovitatakse järgmisi mulla/lahuse suhteid:

— 50 g mulda ja 50 cm^3 uuritava aine vesilahust (suhe 1/1);

▼B

— 10 g mulda ja 50 cm^3 uuritava aine vesilahust (suhe 1/5);

— 2 g mulda ja 50 cm^3 uuritava aine vesilahust (suhe 1/25).

Minimaalne mulla kogus, mida võib katses kasutada, sõltub laboratooriumi võimalustest ja kasutatavate analüüsimeetodite võimelisusest. Siiski soovitatakse kasutada vähemalt 1 g ja eelistatavalt 2 g, et uuringu tulemused oleksid usaldusväärsed.

Ühte kontrollproovi, milles on ainult uuritav aine 0,01 M $CaCl_2$ lahuses (ilma mullata), käideldakse täpselt samamoodi kui katsesüsteemigi, et kontrollida uuritava aine püsivust $CaCl_2$ lahuses ja selle võimalikku adsorptsiooni katseanumate seintele.

Ühele pimekatsele sama koguse mullaga ja lahuse koguruumalaga 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ (ilma uuritava aineta) tehakse sama menetlus. See toimib taustkontrollina analüüside jooksul, et avastada häirivad ained või saastunud mullad.

Kõiki katseid, sealhulgas kontrollid ja pimekatsed, tuleks teha vähemalt kaks korda. Uuringu jaoks ettevalmistatavate proovide koguarvu võib arvutada vastavalt kasutatavale metoodikale.

Eeluuringu ja põhiuuringu meetodid on üldiselt samad, erandid on vajaduse korral mainitud.

Õhu käes kuivatatud mullaproovid tasakaalustatakse, raputades neid koos minimaalselt 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ lahusega terve öö (12 tundi) enne katse tegemise päeva. Hiljem lisatakse teatav kogus uuritava aine põhilahust, et saada lõplikuks mahuks 50 cm. Lisatava põhilahuse maht a) ei tohiks ületada 10 % vesifaasi lõplikust 50 cm^3 suurusest mahust, et tasakaalustamiseelse lahuse omadused muutuksid võimalikult vähe, ja b) peaks olema eelistatavalt selline, et mullaga kokku puutuva uuritava aine esialgne kontsentratsioon (C_0) on analüüsimeetodi avastamispiiriga võrreldes vähemalt kaks suurusjärku kõrgem; see lävi võimaldab mõõtmisi täpselt teha isegi tugeva adsorptsiooni esinemise korral (> 90 %) ja hiljem määratleda adsorptsiooniisotermid. Samuti soovitatakse võimaluse korral, et aine esialgne kontsentratsioon (C_0) ei oleks suurem kui pool selle lahustuvuse piirist.

Allpool esitatakse näide põhilahuse kontsentratsiooni (C_{st}) arvutamise kohta. Eeldatakse, et avastamispiir on 0,01 μg cm–^{3} ja adsorptsioon 90 %; seega peaks mullaga kokkupuutuva uuritava aine esialgne kontsentratsioon olema eelistatavalt 1 μg cm^{-3} (kaks suurusjärku kõrgem kui analüüsimeetodi avastamispiir). Eeldades, et lisatakse maksimaalne soovitatud põhilahuse ruumala, st 5–45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ tasakaalulahust (= 10 % põhilahust vesifaasi 50 cm^3 kogumahust), millega põhilahuse kontsentratsioon peaks olema 10 μg cm^{-3}; see on kolm suurusjärku kõrgem kui analüüsimeetodi avastamispiir.

Vesifaasi pH tuleks mõõta enne ja pärast mullaga kokkupuutumist, kuna sellel on tähtis osa kogu adsorptsiooniprotsessis, eriti ioniseeruvate ainete korral.

▼B

Segu raputatakse adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseni. Tasakaaluoleku püstitumise aeg muldade lõikes erineb suuresti sõltuvalt kemikaalist ja mullast; tavaliselt piisab 24 tunnist (77). Eeluuringus võib proovid koguda järjest 48tunnise segamisperioodi jooksul (näiteks 4., 8., 24. ja 48. tunnil). Siiski tuleks analüüsiajad määrata paindlikult, et võtta arvesse laboratooriumi töögraafikut.

Uuritava aine analüüsimiseks vesilahuses on kaks võimalust: a) paralleelmeetod ja b) jadameetod. Tuleks rõhutada, et kuigi paralleelmeetod on eksperimentaalselt töömahukam, on tulemuste matemaatiline töötlemine lihtsam (5. liide). Siiski jäetakse kasutatava meetodi valik katse läbiviijale, kes peab arvestama kasutatava laboratooriumi võimalusi ja ressursse.

a) Paralleelmeetod: valmistatakse ette nii palju sama mulla/lahuse suhtega proove, kui mitmes ajavahemikus soovitakse adsorptsioonikineetikat uurida. Pärast tsentrifuugimist ja soovi korral pärast filtreerimist regenereeritakse esimese katseklaasi vesifaas võimalikult täielikult ja mõõdetakse nt 4 tunni pärast, vastav teise katseklaasi oma pärast 8. tundi, kolmanda oma pärast 24. tundi jne.

b) Jadameetod: iga mulla/lahuse suhte kohta valmistatakse ette ainult üks kordusproov. Kindlaksmääratud ajavahemike vahel tsentrifuugitakse segu faaside eraldamiseks. Vesifaasist võetakse väike alikvoot, milles kohe analüüsitakse uuritavat ainet; seejärel jätkub katse esialgse seguga. Kui pärast tsentrifuugimist kasutatakse filtreerimist, peavad laboratooriumil olema vahendid väikeste vesialikvootide filtreerimiseks. On soovitatav, et võetud alikvootide koguruumala ei ületaks 1 % lahuse koguruumalast, et mulla/lahuse suhe ei muutuks märkimisväärselt ning adsorptsiooniks olemasoleva soluudi mass ei väheneks uuringu kestel.

Adsorptsiooniprotsent A_{t_i} arvutatakse igal ajahetkel (t_i) nominaalse esialgse kontsentratsiooni alusel ja proovivõtmise hetkel (t_i) mõõdetud kontsentratsiooni korrigeeritakse vastavalt pimekatse A_{t_i} väärtusele. Tasakaaluolekule vastava platoo määramiseks koostatakse graafikud teljestikus aeg (5. liites joonis 1) ([1]). Samuti arvutatakse välja K_d väärtus tasakaaluolekus. Selle K_d väärtuse põhjal valitakse jooniselt 1 välja sobivad mulla/lahuse suhted nii, et adsorptsiooniprotsent on üle 20 % ja eelistatavalt > 50 % (61). Kõik graafikutes kasutatavad võrrandid ja põhimõtted on esitatud punktis „Andmed ja aruandlus” ning 5. liites.

1.9.2.2. *Adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise aja ja tasakaaluolekus adsorbeerunud uuritava aine koguse määramine*

Nii nagu juba mainitud, võimaldavad graafikud teljestikus A_{t_i} or C_{aq}^{ads} – aeg hinnata adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumist ja adsorbeerunud uuritava aine kogust selles. 5. liites esitatud joonised 1 ja 2 on selliste graafikute näidisteks. Tasakaaluoleku püstitumise aeg on see aeg, mida süsteem vajab tasakaaluolekule vastava platoo saavutamiseks.

([1]) Tasakaaluolekule vastava platoo püstitumise hindamiseks võib kasutada ka graafikuid, mis kirjeldavad vesifaasis oleva uuritava aine kontsentratsiooni C_{aq}^{ads} ja aja suhet (vt 5. lisa joonist 2).

▼B

Kui mõne konkreetse mulla puhul saavutatakse tasakaaluolekule vastava platoo asemel pidev kontsentratsiooni tõus, võib see olla tingitud segavatest teguritest, nagu näiteks biolagundamine või aeglane hajumine. Biolagundamist võib näidata, korrates katset steriliseeritud mullaprooviga. Kui tasakaaluolekule vastavat platood ei saavutata ka selle prooviga, peaks katse läbiviija otsima muid nähtusi, mis võiksid olla seotud antud uuringuga; seda võib teha asjakohaste katsetingimuste muutmisega (temperatuur, raputamise ajad, mulla/lahuse suhted). Jäetakse katse tegija otsustada, kas jätkata uuringut, kuigi tasakaaluolek võib jääda püstitumata.

1.9.2.3. *Adsorptsioon katseanuma pinnal ja uuritava aine püsivus*

Mõningat teavet uuritava aine adsorptsiooni kohta katseanuma pinnal ning püsivuse kohta on võimalik tuletada kontrollproove analüüsides. Kui tuvastatakse kontsentratsiooni kahanemine, mis ületab analüüsimeetodi standardvea, võib olla tegu abiootilise lagunemise ja/või adsorptsiooniga katseanuma pinnale. Neid kahte nähtust on võimalik eristada nii, et anuma seinad pestakse põhjalikult sobiva lahusti teadaoleva ruumalaga ja pesemislahuses analüüsitakse uuritava aine kogust. Kui adsorptsiooni katseanuma pinnal ei täheldata, tähistab kontsentratsiooni vähenemine abiootilist ebastabiilsust. Kui tuvastatakse adsorptsioon, tuleb katseanuma materjal ära vahetada. Siiski ei või käesoleva katsega katseanuma pinnale adsorbeerumise kohta saadud teavet otse ekstrapoleerida mulla/lahuse katsele. Mulla olemasolu mõjutab seda adsorptsiooni.

Lisateavet uuritava aine püsivuse kohta on võimalik tuletada, määrates esialgse massitasakaalu aja jooksul. See tähendab, et uuritav aine määratakse vesifaasis, mullaproovides ja katseanuma seintel. Lisatud uuritava kemikaali massi ja vesifaasis oleva uuritava kemikaali masside ja mullast ning katseanuma seintelt saadud ekstraktide summa vaheline erinevus on võrdne alanenud ja/või lendunud ja/või mitteekstraheerunud massiga. Massitasakaalu määramiseks peab adsorptsiooni tasakaaluolek püstituma katse tegemise aja jooksul.

Massitasakaal määratakse mõlema mulla ning ka iga mulla korral ühe muld/lahus suhte jaoks, mille korral on vaesustumine suurem kui 20 % ning eelistatavalt > 50 % tasakaaluolekuga võrreldes. Kui suhte leidmise katse lõpetatakse koos vesifaasist 48 tunni pärast võetud proovi analüüsimisega, eraldatakse faasid tsentrifuugimisega ja soovi korral filtreerides. Vesifaas regenereeritakse niipalju kui võimalik ja mullale lisatakse sobivat ekstrahanti (ekstraktsioonitegurіga vähemalt 95 %), et uuritavat ainet ekstraheerida. Soovitatakse vähemalt kahte järjestikust ekstraheerimist. Määratakse uuritava aine kogus mullas ja katseanuma ekstraktides ja arvutatakse massitasakaal (võrrand 10, „Andmed ja aruandlus”). Kui see on alla 90 %, käsitatakse uuritavat ainet ebapüsivana uuringuks kuluva aja jooksul. Siiski võib uuringut jätkata, võttes arvesse uuritava aine ebapüsivust; sellisel juhul soovitatakse põhiuuringus analüüsida mõlemat faasi.

▼B

1.9.2.4. *2. tase – adsorptsioonikineetika ühel uuritava aine kontsentratsioonil*

Kasutatakse viit mulda, mis on valitud tabelist 1. Nende viie mulla hulka on soovitav lisada võimaluse korral mõned või kõik eeluuringus kasutatud mullad. Sellisel juhul ei tule 2. taset korrata eeluuringus kasutatud muldade puhul.

Tasakaalu saavutamise aeg, mulla/lahuse suhe, mullaproovi mass, mullaga kokkupuutuva vesifaasi ruumala ja uuritava aine kontsentratsioon lahuses valitakse vastavalt eeluuringu tulemustele. Analüüs tuleks teha eelistatavalt siis, kui kokkupuutest on möödunud ligikaudu 2, 4, 6, 8 (võimaluse korral ka 10) ja 24 tundi; raputamise aega võib pikendada maksimaalselt 48 tunnini juhul, kui kemikaal tasakaalu saavutamiseks suhte leidmise tulemuste alusel on vaja rohkem aega. Siiski võib analüüsiaegadesse suhtuda paindlikult.

Iga katse (üks muld ja üks lahus) tehakse vähemalt kask korda, et määrata kindlaks tulemuste varieerumine. Iga katse kohta tehakse üks pimekatse. See koosneb mullast ja 0,01 M $CaCl_2$ lahusest ilma uuritava aineta ning selle mass ja ruumala peavad olema katses kasutatavatega identsed. Kontrollproovile, milles on ainult uuritav aine 0,01 M $CaCl_2$ lahuses (ilma mullata), tehakse sama menetlus, et pakkuda kaitset ootamatuste vastu.

Adsortpsiooniprotsent arvutatakse igal A_{t_i} ja/või $A_{\Delta t_i}$ (vastavalt vajadusele) ja esitatakse graafiliselt ajateljel. Arvutatakse ka jaotustegur K_d tasakaaluolekus ning orgaanilise süsiniku suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur K_{oc} (mittepolaarsete orgaaniliste kemikaalide puhul).

Adsorptsioonikineetika uuringu tulemused

Lineaarne K_d väärtus on üldiselt täpne sorptsioonilise käitumise kirjeldamiseks mullas (35, 78) ja väljendab kemikaalide loomulikku liikuvust mullas. Näiteks kemikaale, mille $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1}, peetakse üldiselt kergesti liikuvateks. Sarnaselt on MacCall *et al*. (16) välja töötanud Koc väärtustel põhineva liikuvuse klassifikatsiooniskeemi. Lisaks on olemas leostumise klassifikatsiooniskeemid, mis põhinevad K_{oc} ja DT-50 suhtel [1] (32, 79).

Vastavalt veaanalüüsi uuringutele (61) ei ole samuti võimalik täpselt määrata K_d väärtusi, mis on alla 0,3 cm^3 $g^{–1}$ vesifaasi vähenenud kontsentratsiooni alusel, isegi siis, kui kasutatakse kõige soovitavamat (täpsuse seisukohast) mulla/lahuse suhet, st 1:1. Sellisel juhul soovitatakse analüüsida nii mulla kui ka lahuse faasi.

[1] DT-50: aeg, mille jooksul 50 % uuritavast ainest on hajunud.

▼B

Seoses eelnevate märkustega soovitatakse kemikaali adsorptsioonilist käitumist ja selle võimalikku liikuvust mullas käsitlevat uuringut jätkata, määrates nendes süsteemides Freundlichi adsorptsiooniisotermid, mille jaoks on võimalik K_d täpselt määrata, kasutades käesolevas katsemeetodis järgitud katseprotokolli. Täpne määramine on võimalik, kui K_d ja mulla/lahuse suhte korrutis on > 0,3, siis kui määramine põhineb kontsentratsiooni langusele vesifaasil (kaudne meetod), või > 0,1, siis kui analüüsitakse mõlemat faasi (otsene meetod) (61).

1.9.2.5. *3. tase – adsorptsiooniisotermid ja desorptsioonikineetika/desorptsiooniisotermid*

1.9.2.5.1. Adsorptsiooniisotermid

Kasutatakse viit uuritava aine kontsentratsiooni, mis hõlmavad soovitavalt kahte suurusjärku; nende kontsentratsioonide valimisel tuleks võtta arvesse lahustuvust vees ja sellest tulenevaid vesilahuse tasakaalukontsentratsioone. Iga mulla kohta tuleks säilitada sama mulla/lahuse suhe kogu uuringu jooksul. Adsorptsioonikatse tehakse vastavalt eespool kirjeldatule, välja arvatud see, et vesifaasi analüüsitakse ainult üks kord ajahetkel, mil on vaja saavutada tasakaal, nagu on määratletud eespool 2. taseme juures. Määratakse lahuse tasakaalukontsentratsioonid ja arvutatakse adsorbeerunud kogus uuritava aine vähenemise alusel lahuses või otsese meetodi abil. Adsorbeerunud mass mulla ühikumassi kohta esitatakse uuritava aine tasakaalukontsentratsiooni funktsioonina (vt „Andmed ja aruandlus”).

Adsorptsiooniisotermide katse tulemused

Siiani esitatud matemaatilistest adsorptsioonimudelitest on Freundlichi isoterm üks kõige sagedamini kasutatav adsorptsiooniprotsesside kirjeldamise mudel. Üksikasjalikum teave adsorptsioonimudelite tõlgendamise ja olulisuse kohta on esitatud viidetes (41, 45, 80, 81, 82).

Märkus. Tuleb märkida, et erinevate ainete K_F väärtuste (Freundlichi adsorptsioonitegur) võrdlemine on võimalik ainult siis, kui need K_F väärtused on väljendatud samades ühikutes (83).

1.9.2.5.2. Desorptsioonikineetika

Käesoleva katse eesmärk on uurida, kas kemikaal on mullal adsorbeerunud pöörduvalt või mittepöörduvalt. See teave on oluline, sest desorptsiooniprotsessil on samuti tähtis osa kemikaali käitumises välitingimustes asuvas mullas. Lisaks on desorptsiooniandmed kasulikuks sisendiks leostumist kirjeldava arvutiga modelleerimise puhul ja lahustunud aineid sisaldava äravoolusimulatsiooni korral. Desorptsiooniuuringu puhul soovitatakse allpool kirjeldatud uuring teha iga süsteemi kohta, mille kohta oli eelneva adsorptsioonikineetika katse käigus võimalik määrata täpne K_d.

Nagu adsorptsioonikineetika katse puhul, on ka desorptsioonikineetika katse tegemiseks kaks võimalust: a) paralleelmeetod ja b) jadameetod. Kasutatava meetodi valik jäetakse katse tegijale, kes peab arvestama kasutatava laboratooriumi võimalusi ja ressursse.

▼B

a) Paralleelmeetod: iga mulla kohta, mis valitakse desorptsiooniuuringu tegemiseks, valmistatakse ette sama mulla/lahuse suhtega nii palju proove, kui mitmes ajavahemikus soovitakse desorptsioonikineetikat uurida. Eelistatavalt tuleks kasutada samasid ajavahemikke, mida kasutati adsorptsioonikineetika katses; siiski võib kogu aeg vajaduse korral pikeneda, et süsteem jõuaks desorptsiooni tasakaaluoleku püstitamiseni. Iga katse (üks muld, üks lahus) korral tehakse üks pimekatse. See koosneb mullast ja 0,01 M $CaCl_2$ lahusest ilma uuritava aineta ja selle mass ja ruumala peavad olema identsed katses kasutatavatega. Kontrollproovile, milles on uuritav aine 0,01 M $CaCl_2$ lahuses (ilma mullata), tehakse sama menetlus. Kõiki mulla ja lahuse segusid raputatakse kuni adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseni (nagu on määratletud eespool 2. taseme juures). Seejärel eraldatakse faasid tsentrifuugimise teel ja vesifaas kõrvaldatakse nii suures ulatuses kui võimalik. Kõrvaldatud lahuse ruumala asendatakse sama ruumala 0,01 M $CaCl_2$ lahusega, milles ei ole uuritavat proovi, ja uusi segusid raputatakse uuesti. Esimese katseklaasi vesifaas regenereeritakse nii täielikult kui võimalik ja mõõdetakse hiljem, nt 2 tunni pärast, vastav teise katseklaasi oma pärast 4. tundi, kolmanda oma pärast 6. tundi jne, kuni desorptsiooni tasakaaluolek on püstitunud.

b) Jadameetod: pärast adsorptsioonikineetika katset tsentrifuugitakse segu ja vesifaas kõrvaldatakse nii suures ulatuses kui võimalik. Kõrvaldatud lahuse ruumala asendatakse sama ruumala 0,01 M $CaCl_2$ lahusega, milles ei ole uuritavat ainet. Uut segu raputatakse desorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseni. Selle aja jooksul tsentrifuugitakse segu kindlaksmääratud ajavahemike järel faaside eraldamiseks. Vesifaasist võetakse väike alikvoot, milles kohe analüüsitakse uuritavat ainet; seejärel jätkub katse esialgse seguga. Iga individuaalse alikvoodi ruumala peaks olema kogumahust alla 1 %. Segule lisatakse sama ruumala värsket 0,01 M $CaCl_2$ lahust mulla/lahuse suhte säilitamiseks ja raputamine jätkub järgmise ajavahemikuni.

Desortpsiooniprotsent arvutatakse igal ajahetkel (D_{t_i}) ja/või ajavahemikul (D_{t_i}) (vastavalt uuringu vajadustele) ja esitatakse graafiliselt ajateljel. Samuti arvutatakse K_{des} desorptsioonitegur tasakaaluolekus. Kõik kasutatavad võrrandid on esitatud punktis „Andmed ja aruandlus” ja 5. liites.

Desorptsioonikineetika katse tulemused

Teljestikus desorptsiooniprotsent (D_{t_i}) ja adsorptsiooniprotsendi A_{t_i}–aeg koostatud graafikute abil on võimalik hinnata adsorptsiooniprotsessi pööratavust. Isegi kui desorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks kulub kaks korda rohkem aega kui adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks ja kogu desorptsioon on üle 75 % adsorbeerunud kogusest, loetakse adsorptsiooni pöörduvaks.

1.9.2.5.3. Desorptsiooniisotermid

Freundlichi desorptsiooniisotermid määratakse muldades, mida on kasutatud adsorptsiooniisotermide katses. Desorptsioonikatse tehakse punktis „Desorptsioonikineetika” kirjeldatud viisil, välja arvatud see, et vesifaasi analüüsitakse ainult üks kord desorptsiooni tasakaaluolekus. Arvutatakse desorbeerunud uuritava aine kogus. Mullale jääv adsorbeerunud uuritava aine kogus desorptsiooni tasakaaluolekus esitatakse uuritava aine tasakaalukontsentratsiooni funktsioonina lahuses (vt „Andmed ja aruandlus” ja 5. liidet).

▼B

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

Analüüsi andmed esitatakse tabelina (vt 6. liidet). Esitatakse individuaalsed mõõtmised ja arvutatud keskmised. Adsorptsiooniisotermid esitatakse graafiliselt. Arvutused tehakse allpool kirjeldatud viisil.

Uuringu tegemisel arvestatakse, et 1 cm^3 vesilahuse mass on 1 g. Mulla/lahuse suhet võib väljendada nii massiprotsendi (w/w) kui ka mahuprotsendi (w/vol) ühikutes sama arvu abil.

2.1. ADSORPTSIOON

Adsorptsiooni A_{t_i} määratletakse kui mullal adsorbeerunud aine protsenti katse alguses olemasolevast kogusest vastavalt katsetingimustele. Kui uuritav aine on püsiv ega adsorbeeru märkimisväärselt anuma seinal, arvutatakse A_{t_i} igal ajahetkel t_i vastavalt järgmisele võrrandile:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \quad (3)$$

kus:

A_{ti} = adsorptsiooniprotsent ajahetkel t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = mullal adsorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i (µg);

m_0 = uuritava aine mass katseklaasis katse alguses (µg).

Üksikasjalik teave adsorptsiooniprotsendi A_{t_i} arvutamise kohta paralleel- ja jadameetodite kasutamise korral on esitatud 5. liites.

Jaotustegur K_d on mullafaasis oleva aine sisalduse ja vesifaasis oleva aine massikontsentratsiooni vaheline suhe katsetingimustes, kui adsorptsiooni tasakaaluolek on püstitunud.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \quad (4)$$

kus:

$C_s^{ads}(eq)$ = mullal adsorbeerunud aine sisaldus adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = aine massikontsentratsioon vesifaasis adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg cm-^{3}). See kontsentratsioon määratakse analüütiliselt, võttes arvesse pimekatsetega saadud väärtusi;

$m_s^{ads}(eq)$ = mullal adsorbeerunud aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg);

m_{soil} = mullafaasi kogus, väljendatud mulla kuivmassina (g);

V_0 = mullaga kokkupuutuva vesifaasi esialgne ruumala (cm^3).

A_{eq} ja K_d vaheline suhe saadakse võrrandist:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

▼B

kus:

A_{eq} = adsorptsiooniprotsent adsorptsiooni tasakaaluolekus, %

Orgaanilise süsiniku suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur K_{oc} seob jaotusteguri K_d mullaproovi orgaanilise süsiniku sisaldusega:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

kus:

%OC = orgaanilise süsiniku protsent mullaproovis (g^{-1}).

K_{oc}-tegur esindab ühtset väärtust, mis iseloomustab peamiselt mittepolaarsete orgaaniliste kemikaalide jaotumist mullas või sademes oleva orgaanilise süsiniku ja vee vahel. Nende kemikaalide adsorptsioon viiakse korrelatsiooni tahke sorbeeriva orgaanilise aine sisaldusega (7); seega sõltuvad K_{oc} väärtused humiinosakeste eriomadustest, mille sorptsioonivõime on sõltuvalt päritolust, tekkest jne märkimisväärselt erinev.

2.1.1. **Adsorptsiooniisotermid**

Freundlichi adsorptsiooniisotermide võrrand seob adsorbeerunud uuritava aine koguse uuritava aine kogusega lahuses tasakaaluolekus (võrrand 8).

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Võrrand (8) on Freundlichi adsorptsioonivõrrand:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

või lineaarsena:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

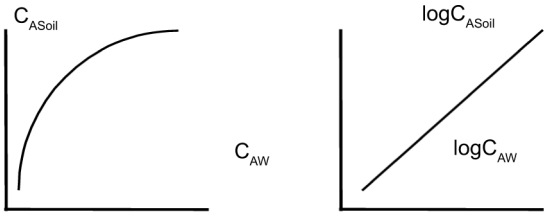
kus:

K_F^{ads} = dimensiooni cm^3 l/m g^{-1}

n = regressioonikonstant; l/n on tavaliselt vahemikus 0,7–1,0, mis näitab, et sorptsiooni puudutavad andmed on sageli natuke mittelineaarsed.

Joonistatakse võrrandid 8 ja 9 ning arvutatakse K_F^{ads} ja l/n väärtused regressioonanalüüsi abil, kasutades võrrandit 9. Arvutatakse ka logaritmvõrrandi korrelatsioonikordaja r^2. Selliste graafikute näited esitatakse joonisel 2.

▼B



Joonis 2. Freundlichi adsorptsioonigraafik, normaalne ja lineaarne.

2.1.2. **Massitasakaal**

Massitasakaalu (MB) määratletakse kui pärast adsorptsiooniuuringut analüütiliselt regenereeritava aineprotsendi suhet aine nominaalsesse kogusesse uuringu alguses.

Andmete töötlemine erineb, kui lahusti lahustub vees täielikult. Vees lahustuva lahusti korral võib kohaldada punktis „Desorptsioon" kirjeldatud andmete töötlemist, et kindlaks määrata lahusti ekstraheerimise abil regenereeritud aine kogus. Kui lahusti veeslahustuvus on väiksem, tuleb regenereeritav kogus mõõta.

Massitasakaal MB adsorptsiooni jaoks arvutatakse järgmiselt: eeldatakse, et tegur (m_E) vastab mullast ja katseanuma seintelt orgaanilise lahusti abil ekstraheeritud uuritavate kemikaalide masside summale:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

kus:

MB = massitasakaal (%)

m_E = mullast ja katseanuma seintelt kahes etapis väljutatud uuritava aine kogumass (μg)

C_0 = mullaga kokku puutuva katselahuse esialgne massikontsentratsioon (μg cm^{-3})

V_{rec} = adsorptsiooni tasakaaluoleku järel regenereeritud supernatandi ruumala (cm^{-3}).

2.2. DESORPTSIOON

Desorptsiooni (D) määratletakse desorbeerunud uuritava aine protsendina eelnevalt adsorbeerunud aine koguse suhtes katsetingimustes:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

kus:

D_{t_i} = desorptsiooniprotsent ajahetkel t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = mullast desorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = mullal adsorbeerunud uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg).

Üksikasjalik teave, kuidas arvutada desorptsiooniprotsenti D_{t^i} paralleel- ja jadameetodite korral, on esitatud 5. liites.

Ilmne desorptsioonitegur (K_{des}) on katsetingimustes mullafaasi jäänud aine sisalduse ja vesilahuses desorbeerunud aine massikontsentratsiooni vaheline suhe, kui desorptsiooni tasakaaluolek on püstitunud:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

kus:

K_{des} = desorptsioonitegur ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = desorbeerunud uuritava aine kogumass desorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

V_T = desorptsioonikineetika uuringu jooksul mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala (cm^3).

Juhised $m_{aq}^{des}(eq)$ arvutamiseks esitatakse 5. liites pealkirja „Desorptsioon” all.

Märkus

Kui eelnev adsorptsiooniuuring tehti paralleelmeetodiga, peetakse võrrandis (12) toodud ruumala V_T sama suureks kui V_0.

2.2.1. **Desorptsiooniisotermid**

Freundlichi desorptsiooniisotermide võrrand seob mullale jääva adsorbeerunud uuritava aine sisalduse uuritava aine kontsentratsiooniga lahuses desorptsiooni tasakaaluolekus (võrrand 16).

Iga katseklaasi kohta arvutatakse mullale jääv adsorbeerunud aine sisaldus desorptsiooni tasakaaluolekus järgmiselt:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ määratletakse

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A\ (\mu g) \quad (14)$$

kus:

$C_s^{des}(eq)$ = mulda jääv adsorbeerunud uuritava aine sisaldus desorptsiooni tasakaaluolekus (μg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = aine analüütiliselt määratud mass vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

▼B

m_{aq}^{A} = osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg):

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist võetud lahuse ruumala desorptsiooni tasakaaluolekus (cm^3);

V_R = adsorptsiooni tasakaaluoleku saavutamise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M $CaCl_2$ lahusega (cm^3).

Võrrand (16) on Freundlichi desorptsioonivõrrand:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

või lineaarsena:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

Kus:

K_F^{des} = Freundlichi desorptsioonitegur;

n = regressioonikonstant;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = aine massikontsentratsioon vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus (μg cm^{-3}).

Võib joonestada võrrandid 16 ja 17 ning arvutada K_F^{des} ja 1/n väärtused regressioonanalüüsi abil, kasutades võrrandit 17.

Märkus

Kui Freundlichi adsorptsiooni või desorptsiooni eksponent l/n on võrdne ühega, võrduvad siduvad Freundlichi adsorptsiooni ja desorptsiooni konstandid (K_F^{ads} ja K_F^{des}) adsorptsiooni või desorptsiooni tasakaalukonstantidega (vastavalt K_d ja K_{des}), ning C_s vs C_{aq} graafikud on lineaarsed. Kui eksponendid ei võrdu ühega, on graafikud teljestikus C_s vs C_{aq} mittelineaarsed ning adsorptsiooni ja desorptsioonikonstandid erinevad isotermide erinevates kohtades.

2.2.2. **Katsearuanne**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet:

— kasutatud mullaproovide täielik identifitseerimine, sealhulgas:

— geograafiline viide asukohale (laiuskraad, pikkuskraad);

— proovivõtu kuupäev;

▼B

— kasutusviis (nt põllumajandusmaa, mets jne);

— proovivõtu sügavus;

— liiva/saviliiva/savi sisaldus;

— pH väärtused (0,01 M $CaCl_2$ lahuses);

— orgaanilise süsiniku sisaldus;

— orgaanilise ainese sisaldus;

— lämmastiku sisaldus;

— C/N suhe;

— katioonide neelamismahutavus (mmol/kg);

— kogu teave mullaproovide kogumise ja ladustamise kohta;

— vajaduse korral kogu oluline teave uuritava aine adsorptsiooni/-desorptsiooni tõlgendamiseks;

— viited iga parameetri määratlemisel kasutatud meetoditele;

— vajaduse korral teave uuritava aine kohta;

— katsete temperatuur;

— tsentrifuugimise tingimused;

— uuritava aine analüüsimisel kasutatud menetlus;

— uuritava aine põhilahuse ettevalmistamisel solubiliseeriva aine kasutamise põhjendus;

— vajaduse korral arvutustes tehtud paranduste selgitamine;

— andmed vastavalt tabeli vormile (6. liide) ja graafilisele esitlemisele;

— kogu teave ja vaatlused, mis aitavad uuringu tulemusi tõlgendada.

3. **VIITED**

1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995 (June 1995).

5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

13) Calvet R., (1980), „Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83–122.

14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31–44.

15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29–35.

16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, pp. 185–190.

18) Rhodes R. C, Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524–528.

19) Russell M. H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901–932.

▼B

21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), „Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269–273.

23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, pp. 45–52.

24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961–971.

25) Osgerby J. M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, pp. 247–258.

26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143–154.

27) Hamaker J. W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

28) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732–210.

29) Hamaker J. W., (1972), „Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49–143.

30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, pp. 37–44.

31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339–357.

33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, pp. 340–350.

34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, pp. 389–395.

35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), „Sorption estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80–101,

36) Lambert S. M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572–576.

▼B

37) Hance R. J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667–668.

38) Briggs G. G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.

39) Briggs G. G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050–1059.

40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243–246.

41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, pp. 29–92.

42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Romberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32 pp. 222–234.

43) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, pp. 833–846.

44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1–17.

45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), „Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49–143.

46) Deli J., and Warren G. F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19: pp. 67–69.

47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". Weed Science, Vol. 23, pp. 454–457.

48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field runoff between the solution and adsorbed phase", CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. „Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements". Soil Sci. Am. Proc, 34, pp. 353–354.

60) Grover R., and Hance R. J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". Soil Sci., pp. 109–138.

61) Boesten, J. J. T. I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31–41.

62) Boesten, J. J. T. I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106". Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C, (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". Weed Res. 21, pp. 227–231.

64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382–386.

65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227–231.

66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297–312.

67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C, (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". Chemosphere, 16(1), pp. 109–116.

68) Lyman W. J., Reehl W. F.and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". Science, Vol. 206, pp. 831–832.

71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C, (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38–42.

72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833–846.

73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilite-reactivite". Revue de l'Agric., 34 (4), pp. 319–322.

74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". Chemosphere, 32(12), pp. 2493–2504.

75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test". Chemosphere 30 (7), pp. 1373–1384.

76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases". Chemosphere 27 (12), pp. 2341–2352.

77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". Weed Research, Vol. 7, pp. 29–36.

78) Koskinen W. C, and Harper S. S., (1990), „The retention processes: mechanisms" in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

80) Giles C. H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms" in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14–32.

81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XL A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". J. Chem. Soc, pp. 3973–93.

82) Calvet R., Terce M., and Arvien J. C, (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caracteristiques generates de l'adsorption". Ann. Agron. 31: pp. 239–251.

83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation", Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

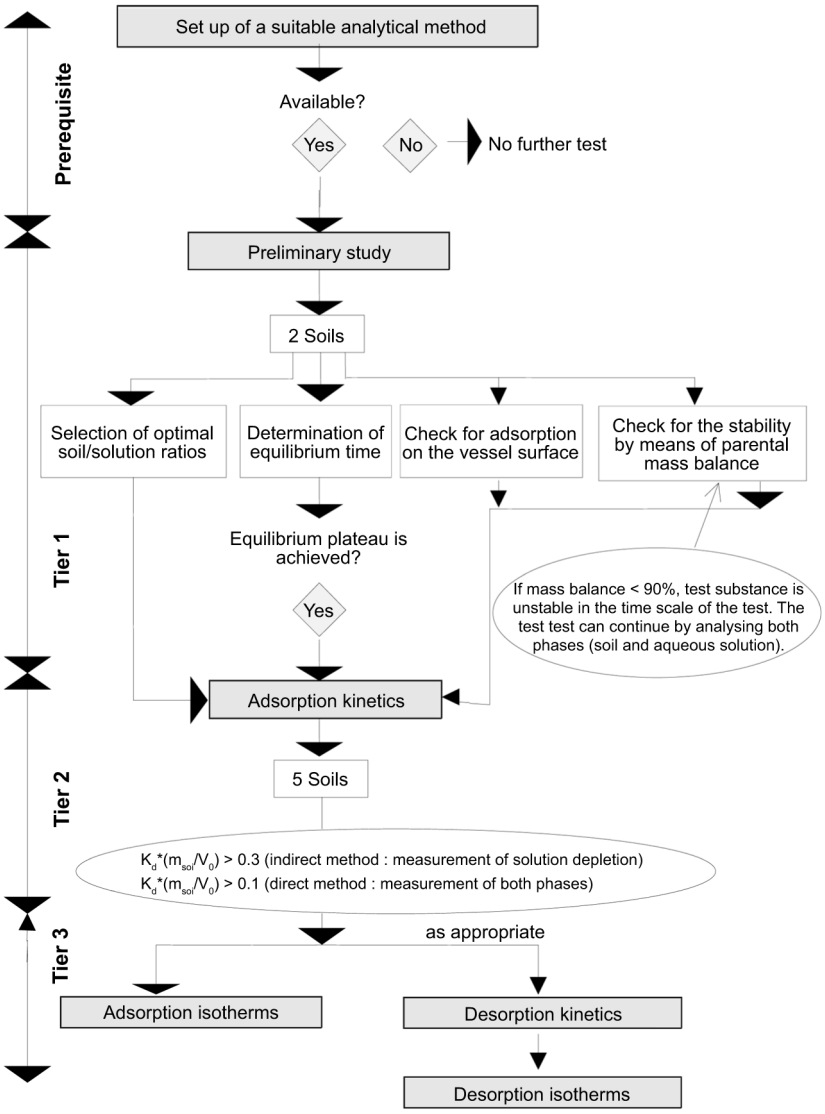
84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption", in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

1. liide

Katse skeem



▼B

2. liide

ANALÜÜSIMEETODI TÄPSUSE JA KONTSENTRATSIOONIMUUTUSE MÕJU ADSORPTSIOONITULEMUSTE TÄPSUSELE

Amount of soil m_{soil} = 10 g

Volume of solution V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)*$ (µg)	$C_s^{ads}(eq)*$ (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
m_0 = 110 µg or C_0=1,100 µg/cm^3	**FOR A = 9 %**							
	100	1,000	true value	10	1,00	true value	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
m_0= 110 µg or C_0=1,100µg/cm^3	**FOR A = 55 %**							
	50,0	0,500	true value	60,0	6,00	true value	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
m_0 = 110 µg or C_0=1,100 µg/cm^3	**FOR A = 99 %**							
	1,100	0,011	true value	108,9	10,89	true value	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}}. \; Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = mass of the test substance in the soil phase at equilibrium, µg;

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = mass of the test substance in the aqueous phase at equilibrium, µg;

$C_s^{ads}(eq)$ = content of the test substance in the soil phase at equilibrium, µg g^{-1};

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = mass concentration of the test substance in the aqueous phase at equilibrium, µg cm^{-3};

R = analytical error in the determination of the $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = calculated error due to the analytical error R.

▼B

3. Liide

K_d HINDAMISE TEHNIKAD

1. Hindamistehnikad võimaldavad ennustada K_d väärtusi, mis põhinevad korrelatsioonil, näiteks P_{ow} väärtustega (12, 39, 63–68), veeslahustuvust puudutavate andmetega (12, 19, 21, 39, 68-73) või polaarsust puudutavate andmetega, mis on saadud pöördfaasilise HPLC kasutamisel (74-76). Tabelites 1 ja 2 esitatud K_{oc} ja K_{om} väärtused on arvutatud nendest võrranditest ja seega K_d kaudselt võrranditest:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1})$$

2. Nende korrelatsioonide kontseptsioon põhineb kahel eeldusel: 1) aine adsorptsiooni mõjutab peamiselt just mullas olev orgaaniline aines; ja 2) kaasatud interaktsioonid on peamiselt mittepolaarsed. Seetõttu 1) ei saa neid korrelatsioone kasutada täielikult või teatud ulatuses polaarsete ainete puhul ja 2) juhtudel, kui mullas esineva orgaanilise ainese sisaldus on väga väike (12). Lisaks, kuigi on avastatud rahuldavad korrelatsioonid P_{ow} ja adsorptsiooni vahel (19), ei saa sama öelda veeslahustuvuse ja adsorptsiooni ulatuse vahelise suhte kohta (19, 21); siiani on sellealased uuringud väga vasturääkivad.

3. Mõned näited adsorptsiooniteguri ja oktanooli-vee jaotusteguri vahelisest korrelatsioonist ja suhtest vees lahustuvusse on esitatud vastavalt tabelites 1 ja 2.

Tabel 1

Näited adsorptsiooni jaotusteguri ja oktanooli-vee jaotusteguri vahelisest korrelatsioonist; rohkem näiteid viidetes 12, 68.

Ained	Korrelatsioonid	Autorid
Asendatud karbamiidid	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromaatsed klooritud ained	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Erinevad pestitsiidid	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Aromaatsed süsivesinikud	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles ja Mantoura (1987) (67)

Tabel 2

Näited adsorptsiooni jaotusteguri ja vees lahustuvuse vahelisest korrelatsioonist; rohkem näiteid viidetes 68, 69.

Ühendid	Korrelatsioonid	Autorid
Erinevad pestitsiidid	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Alifaatsed, aromaatsed klooritud ained	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-naftool	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset *et al*. (1981) (71)
Tsüklilised, alifaatsed aromaatsed ained	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Erinevad ühendid	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

4. liide

ARVUTUSED TSENTRIFUUGIMISTINGIMUSTE MÄÄRAMISEKS

1. Tsentrifuugimisaeg saadakse vastavalt järgmisele valemile, eeldades et osakesed on kerakujulised:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \quad (1)$$

Lihtsustamise eesmärgil kirjeldatakse kõiki parameetreid SI-välistes ühikutes (g, cm).

kus:

ω = pöörlemissagedus (= 2 π rpm/60), rad s^{-1};

rpm = pööret minutis;

η = lahuse viskoossus, g s^{-1} cm^{-1};

r_p = osakese raadius, cm;

ρ_s = mulla tihedus, g cm^{-3};

ρ_{aq} = lahuse tihedus, g cm^{-3};

R_t = vahemaa tsentrifuugi rootori keskkohast tsentrifuugitorus oleva lahuse pinnani, cm;

R_b = vahemaa tsentrifuugi rootori keskkohast tsentrifuugitoru põhjani, cm;

$R_b - R_t$ = mulla/lahuse segu pikkus tsentrifuugitorus, cm.

Üldiselt kasutatakse täieliku eraldumise tagamiseks arvutatud aegade kahekordistamist.

2. Võrrandit 1 on võimalik veel lihtsustada, kui oletada, et lahuse viskoossus (η) ja tihedus (ρ_{aq}) on võrdsed vee viskoossuse ja tihedusega temperatuuril 25 °C; seega, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} ja $\rho_{aq} = 1{,}0$ g, cm^{-3}.

Seega saadakse tsentrifuugimisaeg võrrandiga 2:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \quad (2)$$

3. Võrrandist 2 ilmneb, et tsentrifuugimistingimuste, st aja (t) ja kiiruse (rpm) määratlemisel on tähtsad kaks parameetrit, et saavutada konkreetse suurusega osakeste jagunemine (meie puhul 0,1 μm raadiusega): 1) mulla tihedus ja 2) segu pikkus tsentrifuugitorus (R_b–R_t), st vahemaa, mille mullaosake läbib lahuse pinnalt toru põhjani; on selge, et fikseeritud ruumala korral sõltub segu pikkus torus toru raadiuse ruudust.

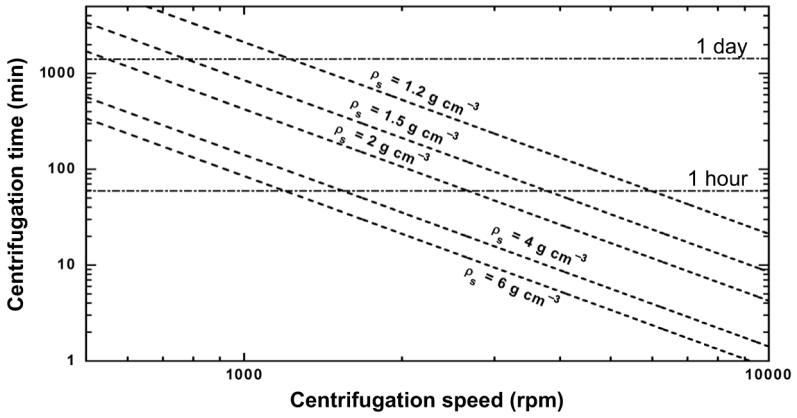
4. Joonisel 1 on näidatud, kuidas tsentrifuugimise kiiruse (rpm) funktsioonina esitatud tsentrifuugimise aeg (t) varieerub erinevate mulla tiheduste (ρ_s) (joonis 1a) ja tsentrifuugitorus oleva segu erinevate pikkuste vahel (joonis 1b). Joonisel 1a on selgesti näha mulla tiheduse mõju; näiteks klassikalise 3000 rpm tsentrifuugimisel on tsentrifuugimise aeg ligikaudu 240 minutit, kui mulla tihedus on 1,2 g/cm^3, ja vaid 50 minutit, kui tihedus on 2,0 g/cm^3. Samamoodi näitab joonis 1b, et klassikalise 3000 rpm tsentrifuugimisel on tsentrifuugimise aeg ligikaudu 50 minutit, kui segu pikkus on 10 cm, ja vaid 7 minutit, kui pikkus on 1 cm. Siiski on tähtis leida optimaalne suhe võimalikult väikest pikkust nõudva tsentrifuugimise ja pärast tsentrifuugimist katse tegija poolt võimalikult lihtsalt faaside eraldamise vahel.

▼B

5. Lisaks, kui määratakse katsetingimused mulla/lahuse faaside eraldamiseks, on tähtis arvestada võimaliku kolmanda „pseudofaasi", kolloidide olemasolu. Nendel osakestel, mille suurus on alla 0,2 μm, võib olla tähtis mõju kogu aine adsorptsioonimehhanismile mulla suspensioonis. Kui tsentrifuugitakse eespool kirjeldatud viisil, jäävad kolloidid vesifaasi ja neid analüüsitakse koos vesifaasiga. Seega jääb teave nende mõju kohta saamata.

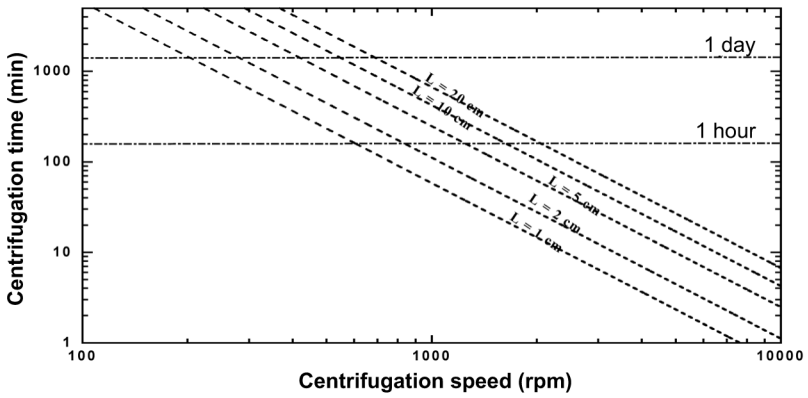
   Kui uuringut tegeval laboratooriumil on ultratsentrifuugimise või ultrafiltreerimise võimalused, võib aine adsorptsiooni/desorptsiooni mullas uurida põhjalikumalt, kaasa arvatud teave aine adsorptsiooni kohta kolloididele. Sellisel juhul tuleks kasutada ultratsentrifuugimist 60 000 rpm/min või ultrafiltreerimist, kui filtri poorsus on 100 000 daltonit, et eraldada järgmised kolm faasi: muld, kolloidid ja lahus. Katsearuannet tuleks samuti vastavalt muuta, et kõigis kolmes faasis ainet analüüsida.

Joonis 1a.



Tsentrifuugimise kiiruse (rpm) funktsioonina esitatud tsentrifuugimise aja (t) varieerumine erinevate mullatiheduste puhul (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b–R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} ja ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} temperatuuril 25 °C.

Joonis 1b.



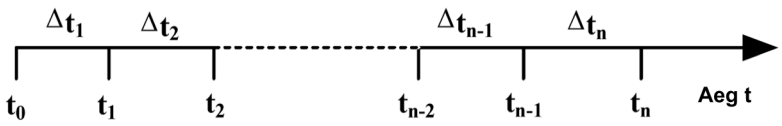
Tsentrifuugimise kiiruse (rpm) funktsioonina esitatud tsentrifuugimise aja (t) varieerumine erinevate pikkuste puhul tsentrifuugimistorus (R_b–R_t) = L; R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} temperatuuril 25 °C ja kui ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

5. liide

ADSORPTSIOONI A (%) JA DESORPTSIOONI D (%) ARVUTAMINE

Menetluse ajagraafik on järgmine:



Kõikide arvutuste puhul eeldatakse, et uuritav aine on püsiv ega adsorbeeru märkimisväärselt konteineri seintele.

ADSORPTSIOON A (A %)

a) *Paralleelmeetod*

Adsorptsiooniprotsent arvutatakse iga katseklaasi (i) kohta igal ajahetkel (t_j) vastavalt võrrandile:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Selle võrrandi tegurid võib arvutada järgmiselt:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s{}^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}{}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

kus:

A_{ti} = A_{ti}

$m_s^{ads}(t_i)$ = uuritava aine mass mullas ajahetkel t_i, kui analüüs tehakse (µg);

m_0 = uuritava aine mass katseklaasis uuringu alguses (µg);

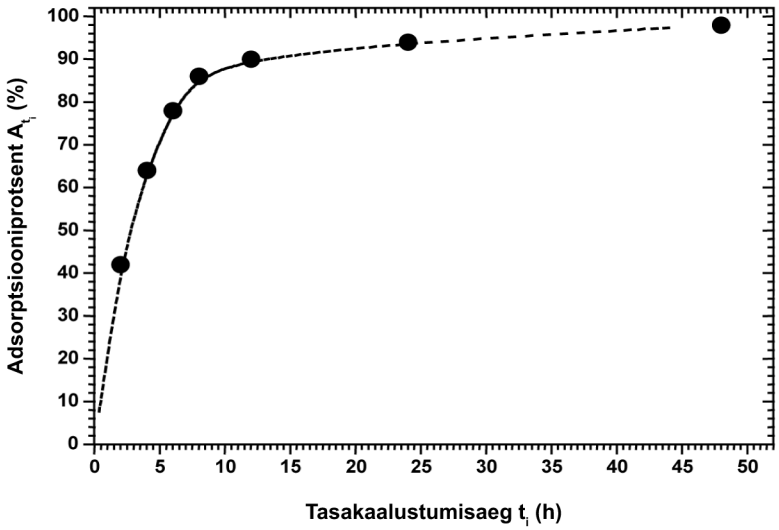
C_0 = mullaga kokkupuutuva katselahuse esialgne massikontsentratsioon (µg cm^{-3});

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = aine massikontsentratsioon vesifaasis analüüsi tegemise ajahetkel t_i (µg cm^{-3}); see kontsentratsioon määratakse analüütiliselt, võttes arvesse pimekatsetega saadud väärtused;

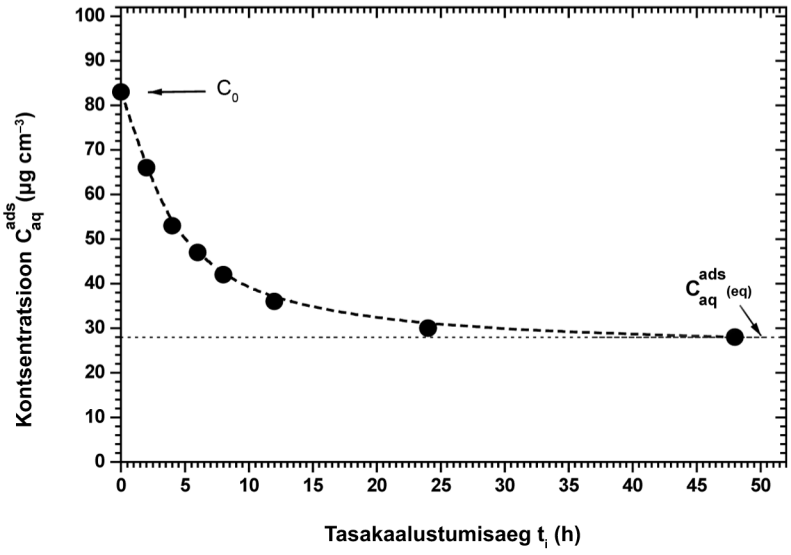
V_0 = mullaga kokkupuutuva uuritava lahuse esialgne ruumala (cm^3).

Adsorptsiooniprotsendi väärtused Ati A_{t_i} või $C_{aq}^{ads}(t_i)$ esitatakse aja funktsioonina ja määratakse aeg, mis kulus sorptsioonitasakaaluoleku püstitumiseks. Näited sellistest graafikutest esitatakse vastavalt joonisel 1 ja 2.



Joonis 1

Adsorptsiooni tasakaaluoleku graafik



Joonis 2

Uuritava aine massikontsentratsioon vesifaasis (C_{aq}) aja funktsioonina

▼B

b) *Jadameetod*

Järgmistes võrrandites võetakse arvesse, et adsorptsioonimenetluseks mõõdetakse uuritavat ainet väikestes vesifaasi alikvootides määratletud ajavahemikel.

— Iga ajavahemiku jooksul arvutatakse mullal adsorbeerunud aine kogus järgmiselt:

— esimese ajavahemiku puhul $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— teise ajavahemiku puhul $\Delta t2 = t2 - t1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— kolmanda ajavahemiku puhul $\Delta t3 = t3 - t2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— n-nda ajavahemiku puhul $\Delta tn = tn - tn\text{-}1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Adsorptsiooniprotsent igas ajavahemikus, $A_{\Delta t_i}$, arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

samal ajal kui desorptsiooniprotsent A_{t_i} ajahetkel t_i saadakse võrrandist:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)$$

Adsorptsiooni väärtused A_{t_i} või $A_{\Delta t_i}$ (vastavalt uuringu vajadustele) esitatakse aja funktsioonina ja määratakse sorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks kuluv aeg.

— Tasakaaluoleku püstitumise hetkel t_{eq}

— mullal adsorbeerunud uuritava aine mass on:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_{i=1}}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— uuritava aine mass lahuses on:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— ja adsorptsiooniprotsent tasakaaluolekus on:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Eespool kasutatud parameetrid määratletakse järgmiselt:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = mullal adsorbeerunud aine mass vastavalt ajavahemike Δ_{t1}, Δ_{t2}, ..., Δ_{tn} jooksul (μg);

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = vastavalt ajahetkedel v_a^A t_1, t_2,... , t_n (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = mullal adsorbeerunud aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

v_a^A = alikvoodi ruumala, milles uuritavat ainet mõõdetakse (cm^3);

$A_{\Delta ti}$ = adsorptsiooniprotsent, mis vastab ajavahemikule Δt_i (%);

A_{eq} = adsorptsiooniprotsent adsorptsiooni tasakaaluolekus (%).

DESORPTSIOON D (%)

Ajahetke t_0, kui desorptsioonikineetika katse algab, peetakse selleks hetkeks, kui uuritava aine maksimaalne eemaldatud ruumala (pärast adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumist) asendatakse sama ruumala 0,01 M $CaCl_2$ lahusega.

a) *Paralleelmeetod*

Ajahetkel t_i mõõdetakse uuritava aine mass katseklaasist i (V_r^i) võetud vesifaasis ja desorbeerunud uuritava aine mass arvutatakse vastavalt võrrandile:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

Desorptsiooni tasakaaluolekus $t_i = t_{eq}$ ja seega $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Ajavahemiku (Δt_i) jooksul desorbeerunud uuritava aine mass saadakse võrrandist:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorptsiooniprotsent arvutatakse:

ajahetkel t_i võrrandist:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \tag{15}$$

ja ajavahemikul (Δt_i) võrrandist:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \tag{16}$$

kus:

D_{t_i} = desorptsiooniprotsent ajahetkel t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = desorptsiooniprotsent, mis vastab ajavahemikule Δt_j (%);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = desorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = ajavahemikul Δt_j desorbeerunud uuritava aine mass (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = ajahetkel t_i analüütiliselt määratud uuritava aine mass lahuse ruumalas V_r^i, mis võetakse analüüsi jaoks (μg);

m_{aq}^A = osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = uuritava aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

V_R = adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M $CaCl_2$ lahusega (cm^3);

V_r^i = uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist (i) võetud lahuse ruumala desorptsioonikineetika katses (cm^3).

Desorptsiooni väärtused D_t^i või D_{t^i} (vastavalt uuringu vajadustele) esitatakse aja funktsioonina ja määratakse desorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks kuluv aeg.

b) *Jadameetod*

Järgmistes võrrandites võetakse arvesse, et eelnevaks adsorptsioonimenetlus viidi läbi, määrates uuritava aine väikestes vesifaasi alikvootides (v_a^A) (jadameetod punktis 1.9 „Katse käik”). Eeldatakse, et a) pärast adsorptsioonikineetika katset katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala asendati sama ruumala 0,01 M $CaCl_2$ lahusega (v_R) ja b) desorptsioonikineetika katse jooksul mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala (v_T) püsib konstantsena ja esitatakse võrrandiga:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

Ajahetkel t_i:

— määratakse uuritava aine mass väikeses alikvoodis (v_a^D) ja arvutatakse desorbeerunud mass vastavalt võrrandile:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— desorptsiooni tasakaaluolekus, $t_i = t_{eq}$, seegam$_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— desorptsiooniprotsent D_{t_i} arvutatakse järgmisest võrrandist:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Ajavahemikus (Δt_i)

Iga ajavahemiku jooksul arvutatakse desorbeerunud aine kogus järgmiselt:

— esimese ajavahemiku puhul $\Delta_{t1} = t_1 - t_0$ ja

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ ja } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— ajavahemiku n puhul $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) \quad (22)$$

ja

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— teise ajavahemiku puhul $\Delta t2 = t2 - t1$ ja

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \quad (23)$$

ja

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Lõpuks arvutatakse desorptsiooniprotsent igas ajavahemikus, $D_{\Delta t_i}$, kasutades järgmist võrrandit:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

samal ajal kui desorptsiooniprotsent D_{t_i} ajahetkel t_i saadakse võrrandist:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

milles eespool kasutatud parameetrid määratletakse järgmiselt:

$m^{des}(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_s(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_s(\Delta t_n)$ = aine mass, mis jääb mullale adsorbeerununa vastavalt pärast ajavahemike Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n möödumist (μg);

$m^{des}{}_{aq}(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_{aq}(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_{aq}(\Delta t_n)$ = uuritava aine mass, mis on desorbeerunud vastavalt ajavahemike Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n jooksul (μg);

$m^{des}{}_m(t_1)$, $m^{des}{}_m(t_2)$,... , $m^{des}{}_m(t_n)$ = vastavalt ajahetkedel($v^D{}_a$) t_1, t_2, ..., t_n (μg)

V_T = desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga mullaga Kokku puutuva vesifaasi koguruumala (cm^3);

$m^A{}_{aq}$ = osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg)

$$m^A_{aq} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i) \right) - V_R}{(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i))} \right) \cdot m^{ads}_{aq}(eq) \qquad (26)$$

V_R = adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M $CaCl_2$ lahusega (cm^3);

$v^D{}_a$ = desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga analüütilisel eesmärgil katseklaasist (i) võetud alikvoodi ruumala (cm^3);

$$v^D{}_a \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

6. lisa

ADSORPTSIOON-DESORPTSIOON MULDADES: ANDMETE ESITAMISE LEHED

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: .....°C

Analüüsimeetodi sobivus

Kaalutud muld	g	
Muld: kuivmass	g	
$CaCl_2$ lahuse ruumala	cm^3	
Lõpliku lahuse arvutatud kontsentratsioon	$\mu g\ cm^{-3}$	
Lõpliku lahuse määratud kontsentratsioon	$\mu g\ cm^{-3}$	

Kasutatud analüüsimeetodi põhimõte:

Analüüsimeetodi kaliibrimine:

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: .....°C

Kasutatud analüüsimetoodika: Kaudne ☐ Paralleelne ☐ Jada ☐

Otsene ☐

Adsorptsiooni uuring: uuritavad proovid

	Tähis	Ühikud	Tasakaaluoleku saabumise aeg		Tasakaaluoleku saabumise aeg		Tasakaaluoleku saabumise aeg		Tasakaaluoleku saabumise aeg	
Katseklaas nr										
Kaalutud muld	—	g								
Muld: kuivmass	m_{soil}	g								
Vee ruumala kaalutud mullas (arvutatud)	V_{WS}	cm^3								
Mulla tasakaalustamiseks kasutatud 0,01 M $CaCl_2$ lahuse ruumala		cm^3								
Põhilahuse ruumala		cm^3								
Mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala	V_0	cm^3								
Uuritava lahuse esialgne kontsentratsioon	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Uuritava aine mass uuringu alguses	m_0	µg								

▼B

	Tähis	Ühikud	Tasakaaluoleku saabumise aeg		Tasakaaluoleku saabumise aeg		Tasakaaluoleku saabumise aeg		Tasakaaluoleku saabumise aeg	
Pärast loksutamist ja tsentrifuugimist										
KAUDNE MEETOD										
Paralleelmeetod										
Uuritava aine kontsentratsioon vesifaasis, sisaldab pimekatsest tulenevat parandust	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Jadameetod										
Uuritava aine mõõdetud mass alikvoodis$_a$[A]	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
OTSENE MEETOD										
Mullal adsorbeerunud uuritava aine mass	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Adsorptsiooni arvutamine										
Adsorptsioon	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Keskmised										
Adsorptsioonitegur	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Keskmised										
Adsorptsioonitegur	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Keskmised										

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: .....°C

Adsorptsiooni uuring: pimekatsed ja kontroll

	Tähis	Ühikud	Pimekatse		Pimekatse		Kontroll	
Katseklaas nr								
Kaalutud mullad		g					0	0
Vee kogus kaalutud mullas (arvutatud)		cm^3					—	—
Lisatud 0,01 M $CaCl_2$ lahuse ruumala		cm^3						
Lisatud uuritava aine põhilahuse ruumala		cm^3	0	0				
Vesifaasi koguruumala (arvutatud)		cm^3					—	—

▼B

	Tähis	Ühikud	Pimekatse		Pimekatse		Kontroll	
Uuritava aine esialgne kontsentratsioon vesifaasis		µg cm^{-3}						

Pärast loksutamist ja tsentrifuugimist

Kontsentratsioon vesifaasis		µg cm^{-3}						

Märkus: Vajaduse korral lisada veerge.

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: .....°C

Massibilanss

	Tähis	Ühikud				
Katseklaas nr						
Kaalutud muld	—	g				
Muld: kuivmass	m_{soil}	g				
Vee ruumala kaalutud mullas (arvutatud)	V_{WS}	ml				
Mulla tasakaalustamiseks kasutatud 0,01 M $CaCl_2$ lahuse ruumala		ml				
Põhilahuse ruumala		cm^3				
Mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala	V_0	cm^3				
Uuritava lahuse esialgne kontsentratsioon	C_0	µg cm^{-3}				
Tasakaaluoleku saabumise aeg	—	h				
Pärast loksutamist ja tsentrifuugimist						
Uuritava aine kontsentratsioon vesifaasis tasakaaluolekus, sisaldab pimekatsest tulenevat parandust	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Tasakaaluoleku saabumise aeg	t_{eq}	h				
Esimene lahjendamine lahustiga						
Eemaldatud vesifaasi ruumala	V_{rec}	cm^3				
Lisatud lahusti ruumala	ΔV	cm^3				
Esimene ekstraheerimine lahustiga						
Lahustis analüüsitud signaal	S_{E1}	var.				
Uuritava aine kontsentratsioon lahustis	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Tähis	Ühikud				
Mullast ja anuma seintelt ekstraheeritud aine mass	m_{E1}	µg				
Teine lahjendamine lahustiga						
Eemaldatud lahusti ruumala	ΔV_s	cm^3				
Lisatud lahusti ruumala	$\Delta V'$	cm^3				
Teine ekstraheerimine lahustiga						
Lahustifaasis analüüsitud signaal	S_{E2}	var.				
Uuritava aine kontsentratsioon lahustis	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Mullast ja anuma seintelt ekstraheeritud aine mass	m_{E2}	µg				
Kahes etapis ekstraheeritud uuritava aine kogumass	m_E	µg				
Massibilanss	MB	%				

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: .....°C

Adsorptsiooniisotermid

	Tähis	Ühikud								
Katseklaas nr										
Kaalutud muld	—	g								
Muld: kuivmass	E	g								
Vee ruumala kaalutud mullas (arvutatud)	V_{WS}	cm^3								
Mulla tasakaalustamiseks kasutatud 0,01 M $CaCl_2$ lahuse ruumala		cm^3								
Lisatud põhilahuse ruumala		cm^3								
Mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala (arvutatud)	V_0	cm^3								
Lahuse kontsentratsioon	C_0	µg cm^{-3}								
Tasakaaluoleku saabumise aeg	—	h								

▼B

	Tähis	Ühikud								
Pärast loksutamist ja tsentrifuugimist										
Aine kontsentratsioon vesifaasis, sisaldab pimekatsest tulenevat parandust	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatuur		°C								
Mullaühiku kohta adsorbeerunud mass	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regressioonanalüüs:

K_F^{ads} väärtus:

l/n väärtus:

regressioonitegur r^2:

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: .....°C

Kasutatud analüüsimetoodika: Kaudne ☐ Paralleelne ☐ Jada ☐

Desorptsiooni uuring

		Tähis	Ühikud	Ajavahemik	Ajavahemik	Ajavahemik	Ajavahemik
Katseklaasi nr, saadakse adsorptsioonietapist							
Mullal adsorbeerunud aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Eemaldatud vesifaasi ruumala, mis asendati 0,01 M $CaCl_2$-ga		V_R	cm^3				
Mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus		m_{aq}^A	µg				
Desorptsiooni kineetika							
Mullast desorbeerunud aine mõõdetud mass ajahetkel t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist (i) võetud lahuse ruumala	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Mullast desorbeerunud aine mass ajahetkel t_i (arvutatud)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Mullast ajavahemikus Δt_i desorbeerunud aine mass (arvutatud)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Tähis	Ühikud	Ajavahe-mik	Ajavahe-mik	Ajavahe-mik	Ajavahe-mik
Desorptsiooni protsent						
Desorptsioon ajahetkel t_i	D_{t_i}	%				
Desorptsioon ajavahemikus Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Näiline desorptsioonitegur	K_{des}					

PM: paralleelmeetod

SM: jadameetod

▼B

C.19. **ADSORPTSIOONITEGURI (K_{OC}) KINDLAKSMÄÄRAMINE-MULLAS JA REOVEESETTES KÕRGSURVEVEDELIKKRO-MATOGRAAFIA (HPLC) ABIL**

1. **MEETOD**

Käesolev meetod lähtub OECD juhendist TG 121 (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Ainete sorptsiooni muldadesse ja kanalisatsioonijääkidesse võib kirjeldada parameetrite abil, mida saab katseliselt kindlaks määrata meetodi C.18 abil. Üheks oluliseks parameetriks on adsorptsioonitegur, mida määratletakse kui suhet mullas/reoveesettes oleva aine kontsentratsiooni ja vesifaasis oleva aine kontsentratsiooni adsorptsiooni tasakaalu tingimuste vahel. Mulla orgaanilise süsiniku sisalduse suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur K_{oc} on kasulik näitaja, mis iseloomustab kemikaali seostumisvõimet mulla orgaanilise ainese või reoveesettega ning võimaldab võrrelda erinevaid kemikaale. Seda parameetrit võib hinnata veeslahustuvuse ja n-oktanooli/vee jaotusteguri vaheliste korrelatsioonide abil (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Käesolevas uuringus kirjeldatud katsemeetodis kasutatakse HPLCd adsorptsiooniteguri K_{oc} määratlemiseks mullas ja reoveesettes (8). Need näitajad on usaldusväärsemad kui QSAR-arvutustega saadud näitajad (9). Kuna tegemist on hinnangulise meetodiga, ei saa see täielikult asendada katsemeetodis C.18 kasutatud partii tasakaalustamise katseid. Siiski võib kindlaksmääratud K_{oc} väärtust kasutada selleks, et valida sobivad katseparameetrid adsorptsiooni/desorptsiooni uuringute jaoks vastavalt katsemeetodile C.18, arvutades K_d (jaotustegur) või K_f (Freundlichi adsorptsioonitegur) vastavalt võrrandile 3 (vt punkti 1.2).

1.2. MÕISTED

K_d – jaotustegur on lahustunud uuritava aine tasakaalukontsentratsioonide C suhe kahefaasilises süsteemis, mis koosneb sorbendist (muld või reoveesete) ja vesifaasist; see on dimensioonita väärtus, kui kontsentratsioonid mõlemas faasis on väljendatud massiprotsendina. Juhul kui kontsentratsioon vesifaasis esitatakse massi ja ruumala suhtena, on ühikuteks ml g^{-1}. K_d võib muutuda vastavalt sorbendi omadustele ning sõltuda kontsentratsioonist.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

kus:

C_{soil} = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon mullas (μg· g^{-1})

C_{sludge} = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon jääkides (μg· g^{-1})

C_{aq} = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon vesifaasis (μg· g^{-1}, (μg· ml^{-1}).

▼B

K_f – Freundlichi adsorptsioonitegur on uuritava aine kontsentratsioon mullas või reoveesettes (x/m), kui tasakaalukontsentratsioon Caq vesifaasis on üks; ühikud on μg· g^{-1} sorbenti. Väärtus võib muutuda sõltuvalt sorbendi omadustest.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

kus:

x/m = sorbendi kogusesse m (g) adsorbeerunud uuritava aine kogus x (μg) tasakaaluolekus

l/n = Freundlichi adsorptsiooniisotermi kõver

C_{aq} = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon vesifaasis (μg· ml^{-1})

$$AtC_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc} – sorbendi orgaanilise süsiniku sisalduse (f_{oc}) suhtes normaliseeritud aine jaotustegur (K_d) või Freundlichi adsorptsioonitegur (K_f); eriti mitteioniseerumata kemikaalide korral on see ligikaudseks indikaatoriks aine ja sorbendi vahelise adsorptsiooni ulatuse määramisel ning võimaldab võrrelda erinevaid kemikaale. Olenevalt K_d ja K_f mõõtmetest võib K_{oc} olla dimensioonita suurus või omada ühikuid ml· g_{-1} või $\mu g \cdot g_{-1}$ orgaanilist ainest.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\left(\text{dimensionless or ml} \cdot g^{-1}\right) \text{ or } \frac{Kf}{foc}\left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

K_{oc} ja K_d vaheline suhe ei ole alati lineaarne ja seega võivad K_{oc} väärtused mullati erineda, kuid nende varieerivus on palju väiksem võrreldes K_d või K_f väärtustega.

Adsorptsioonitegur (K_{oc}) tuletatakse võimsustegurist (k'), kasutades kaliibrimisgraafikut, milles log k' esitatakse log K_{oc} funktsioonina valitud võrdlusühendite kohta.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kus:

t_R = uuritava aine ja võrdlusaine HPLC peetumisaeg (minutites)

t_0 = HPLC surnud aeg (minutites) (vt punkti 1.8.2).

P_{ow} – oktanooli/vee jaotustegur on n-oktanooli ja vette lahustunud aine kontsentratsioonide suhe, mis on ilma dimensioonita väärtus

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq} (= Kow) \quad (5)$$

1.3. VÕRDLUSAINED

Enne meetodi kasutamist peavad olema teada struktuurivalem, puhtus ja dissotsiatsioonikonstant (vajaduse korral). Kasulik on ka teave vees ja orgaanilistes lahustites lahustuvuse, oktanooli/vee jaotusteguri ja hüdrolüüsi omaduste kohta.

▼B

Selleks, et uuritava aine mõõdetud HPLC-retentsiooniandmeid saaks korrelleerida uuritava aine adsorptsiooniteguri K_{oc}-ga, tuleb joonistada kaliibrimisgraafik, milles log K_{oc} esitatakse log k' funktsioonina. Kasutada tuleks minimaalselt kuut võrdluspunkti, millest vähemalt üks on madalam ja üks kõrgem kui uuritava aine eeldatav väärtus. Meetodi täpsus paraneb märgatavalt, kui kasutatakse võrdlusaineid, mis on struktuurilt uuritava ainega seotud. Kui sellised andmed ei ole kättesaadaval, valib kasutaja ise sobivad kaliibrimisained. Sellisel juhul tuleks valida struktuuriliselt heterogeensed ained. Kasutamiseks sobivad ained ja K_{oc} väärtused on esitatud reoveesette puhul liite tabelis 1 ja mulla puhul tabelis 3. Teiste kaliibrimisainete valikut tuleks põhjendada.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

HPLC tehakse analüütilistes kolonnides, mis on täidetud müügiloleva tsüanopropüüli faasiga, mis sisaldab lipofiilseid ja polaarseid struktuuriühikuid. Kasutatakse mõõdukalt polaarset statsionaarset faasi, mis põhineb ränidioksiidmaatriksil:

- O - Si	- CH_2 - CH_2 - CH_2	- CN
Ränidioksiid	Mittepolaarne spacer-aine	Polaarne struktuuriühik

Katsemeetodi põhimõte on sarnane meetodiga A.8 (jaotustegur, HPLC-meetod). Kui uuritav aine läbib kolonni koos liikuva faasiga, reageerib see statsionaarse faasiga. Kuna uuritav aine jaguneb liikuva ja statsionaarse faasi vahel, aeglustub selle liikumine. Kuna statsionaarses faasis on nii polaarseid kui mittepolaarseid osasid, võivad molekulide polaarsed ja mittepolaarsed rühmad reageerida samal viisil kui orgaaniline aines mulla- või reoveesette maatriksites. See võimaldab määrata kolonniga seotud peetumisaja ja orgaanilise ainese adsorptsiooniteguri vahelise suhte.

pH-l on märkimisväärne mõju sorptsioonile, eriti polaarsete ainete puhul. Põllumajandusmaa või reoveepuhastusjaamade mahutite pH on tavaliselt vahemikus pH 5,5–7,5. Ioniseeruvate ainete korral tuleks teha kaks uuringut nii ioniseeritud kui ioniseerimata kujul sobivates puhverlahustes, kuid ainult siis, kui vähemalt 10 % katseühenditest dissotsieerub vahemikus pH 5,5–7,5.

Kuna määramisel kasutatakse ainult HPLC-kolonniga seotud peetumisaja ja adsorptsiooniteguri vahelist suhet, ei ole kvantitatiivset analüüsimeetodit tarvis ja määrata tuleb ainult peetumisaeg. Kui kasutatakse sobivaid võrdlusaineid ja katse tingimused on standardsed, võimaldab see meetod kiiresti ja efektiivselt määrata adsorptsiooniteguri K_{oc}.

1.5. UURINGU KASUTATAVUS

HPLC-meetod sobib selliste keemiliste ainete jaoks (märgistamata või märgistatud), mille jaoks on saadav sobiv tuvastamissüsteem (nt spektrofotomeeter, radioaktiivsuse detektor) ja mis on katse tegemise jooksul piisavalt püsivad. See võib olla eriti kasulik selliste kemikaalide puhul, mida on raske uurida muude katsesüsteemidega (st lenduvad ained; ained, mis ei lahustu vees kontsentratsioonil, mida on võimalik analüütiliselt mõõta; inkubatsioonisüsteemide pinna suhtes suurt afiinsust omavad ained). Meetodit saab kasutada segude puhul, mille korral ei ole võimalik elueerimisribasid eristada. Sellisel juhul tuleks märkida ära uuritavate ainete segu ühendite log K_{oc} väärtuste ülemine ja alumine piir.

▼B

Lisandid võivad mõnikord põhjustada probleeme HPLC-tulemuste tõlgendamisel, kuid need ei ole väga olulised, kui uuritavat ainet on võimalik analüütiliselt selgelt identifitseerida ja lisanditest eraldada.

See meetod on valideeritud liite tabelis 1 loetletud ainete jaoks ja seda on kasutatud ka paljude teiste kemikaalide puhul, mis kuuluvad järgmistesse kemikaalide klassidesse:

— aromaatsed amiinid (nt trifluraliin, 4-klooraniliin, 3,5-dinitroaniliin, 4-metüülaniliin, N-metüülaniliin, 1-naftüülamiin);

— aromaatsed karboksüülhappe estrid (nt bensoehappe metüülester, 3,5-dinitrobensoehappe etüülester);

— aromaatsed süsivesinikud (nt tolueen, ksüleen, etüülbenseen, nitrobenseen);

— arüüloksüfenoksüpropioonhappe estrid (nt diklofop-metüül, fenoksaprop-etüül, fenoksaprop-P-etüül);

— bensimidasool- ja imidasoolfungitsiidid (nt karbentasiim, fuberidasool, triasoksiid);

— karboksüülhappe amiidid (nt 2-klorobensamiid, N,N-dimetüülbensamiid, 3,5-dinitrobensamiid, N-metüülbensamiid, 2-nitrobensamiid, 3-nitrobensamiid);

— klooritud süsivesinikud (nt endosulfaan, DDT, heksaklorobenseen, kintoseen, 1,2,3-triklorobenseen);

— orgaanilist fosforit sisaldavad insektitsiidid (nt metüülasiinfoss, disulfotoon, fenamifoss, isofeenfoss, pürasofoss, sulprofoss, triasofoss);

— fenoolid (nt fenool, 2-nitrofenool, 4-nitrofenool, pentaklorofenool, 2,4,6-triklorofenool, 1-naftool);

— fenüülkarbamiidi derivaadid (nt isoproturoon, monolinuroon, pentsükuroon);

— värvained (nt Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);

— polüaromaatsed süsivesinikud (nt atsenafteen, naftaleen);

— 1,3,5-triasiinherbitsiidid (nt prometrüün, propasiin, simasiin, terbutrüün);

— triasooli derivaadid (nt tebukonasool, triadimefoon, tradimenool, triapentenool).

Meetodit ei kasutata ainete puhul, mis reageerivad kas eluendi või statsionaarse faasiga. Samuti ei kasutata seda ainete puhul, mis reageerivad spetsiifilisel viisil anorgaaniliste ühenditega (nt moodustavad klasterkomplekse savimineraalidega). Meetod ei pruugi toimida ka pindaktiivsete ainete, anorgaaniliste ühendite ja mõõdukalt tugevate või tugevate orgaaniliste hapete ja aluste korral. Kindlaks võib määrata log K_{oc} väärtused vahemikus 1,5–5,0. Tuleb määrata ioniseeruvad ained, kasutades puhverdatud liikuvat faasi, kuid hoolitseda tuleb selle eest, et puhvri komponendid ega uuritav aine ei sadestuks.

▼B

1.6. KVALTITEEDIKRITEERIUMID

1.6.1. **Täpsus**

Tavaliselt saab uuritava aine adsorptsiooniteguri määrata täpsusega ± 0,5 logaritmiühikut perioodilise tasakaalu meetodiga määratud väärtusest (vt liites olevat tabelit 1). Suurema täpsuse võib saavutada, kui kasutatakse võrdlusaineid, mis on struktuurilt uuritava ainega seotud.

1.6.2. **Korratavus**

Määramised tuleks teha vähemalt kaks korda. Individuaalsetest määramistest tuletatud log K_{oc} väärtused peaksid jääma vahemikku 0,25 logaritmiühikut.

1.6.3. **Reprodutseeritavus**

Meetodi kasutamisest saadud kogemused toetavad selle valiidsust. HPLC-meetodi uurimine, milles kasutati 48 ainet (enamasti pestitsiidid), mille kohta on olemas usaldusväärsed mulla K_{oc} kohta käivad andmed, andis korrelatasioonikordaja R = 0,95 (10, 11).

Meetodi tõhustamiseks ja valideerimiseks viidi läbi laboratooriumidevaheline võrdlusuuring, milles osales 11 laboratooriumi (12). Tulemused on esitatud liite tabelis 2.

1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.7.1. **Adsorptsiooniteguri esialgne määramine**

Oktanooli/vee jaotustegurit P_{ow} (= K_{ow}) ja teatud ulatuses ka vees lahustuvust saab kasutada adsorptsiooni ulatuse indikaatoritena, eriti ioniseerimata ainete korral, ja seega kasutada esialgse ulatuse leidmiseks. Paljude kemikaalide rühmade kohta on avaldatud mitmeid kasulikke korrelatsioone (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

1.7.2. **Seadmed**

Vajalik on mittepulseeriva pumba ja sobiva tuvastamisseadmega vedelikkromatograafi olemasolu. Soovitatakse kasutada klapp-pihustit, millel on sisestus silmus. Kasutatakse müügilolevaid ränidioksiidist alusega tsüanopropüülsidemega seotud vaike (nt Hypersil ja Zorbax CN). Sama aine juhtkolonni võib asetada sisestussüsteemi ja analüütilise kolonni vahele. Erinevate tarnijate kolonnid võivad oma eraldamise efektiivsuse suhtes märkimisväärselt varieeruda. Juhisena tuleks üritada saavutada järgmised võimsustegurid k': log k' > 0,0, kui log K_{oc} = 3,0, ja log k' > – 0,4, kui log K_{oc} = 2,0, kasutades metanooli/vee suhet 55/45 % liikuva faasina.

1.7.3. **Liikuvad faasid**

Uuritud on mitmeid liikuvaid faase ja soovitatakse kahte järgmist:

— metanool/vesi (55/45 mahuprotsenti);

— metanool/0,01 M tsitraatpuhver pH 6,0 (55/45 mahuprotsenti).

▼B

Elueerimislahusti valmistamiseks tuleb kasutada HPLC-puhast metanooli ja destilleeritud vett või tsitraatpuhvrit. Enne kasutamist segud degaseeritakse. Kasutada tuleb isokraatilist elueerimist. Kui metanooli/vee segud ei sobi, võib kasutada teisi orgaanilise lahusti ja vee segusid, näiteks etanooli ja vee segu või atsetonitriili ja vee segu. Ioniseeruvate ühendite korral soovitatakse kasutada puhverlahust pH stabiliseerimiseks. Tuleb hoolitseda selle eest, et sool ei ladestuks ja kolonn ei manduks, mida võib mõningate orgaaniliste faaside/puhversegude korral esineda.

Kasutada ei tohi mingeid lisaaineid, nagu näiteks ioonpaari reaktiive, sest need võivad mõjutada statsionaarse faasi sorptsiooni omadusi. Sellised statsionaarse faasi muutused võivad olla pöördumatud. Seetõttu on kohustuslik lisaaineid kasutavad katsed viia läbi eraldi kolonnides.

1.7.4. **Soluudid**

Uuritavad ained ja võrdlusained tuleks lahustada liikuvas faasis.

1.8. KATSE KÄIK

1.8.1. **Katsetingimused**

Temperatuur mõõtmiste kestel tuleks dokumenteerida. Väga soovitatav on kasutada reguleeritava temperatuuriga kolonni, et tagada püsivad tingimused kaliibrimise ja hindamise katsete jooksul ning uuritava aine määramisel.

1.8.2. **Surnud aja t_0 määramine**

Surnud aja t_0 määramiseks võib kasutada kahte erinevat meetodit (vt ka punkti 1.2).

1.8.2.1. *Surnud aja t_0 määramine, kasutades homoloogilist rida*

See menetlus on andnud usaldusväärseid ja standardiseeritud t_0 väärtusi. Üksikasju vt katsemeetodit käsitlevas punktis A.8: jaotustegur (n-oktanool/vesi), HPLC-meetod.

1.8.2.2. *Surnud aja t_0 määramine inertsete ainete abil, mis ei jää kolonni*

See tehnika põhineb formamiidi, karbamiidi või naatriumnitraadi lahuste lisamisel. Määramisi tuleks teha vähemalt kaks korda.

1.8.3. **Peetumisaegade t_R määramine**

Võrdlusained tuleks valida punktis 1.3 kirjeldatud viisil. Need võib sisestada segastandardina peetumisaegade kindlaksmääramiseks, tingimusel, et on tõendatud, et ühegi võrdlus standardi peetumisaega ei mõjuta teiste võrdlusstandardite juuresolek. Kaliibrimine tuleks teha korrapäraste ajavahemike tagant vähemalt kaks korda päevas, et oleks võimalik seletada kolonni tulemuste ootamatuid muutusi. Kaliibrimissisestused soovitatakse teha enne ja pärast uuritava aine sisestamist, et saada kinnitust selle kohta, et peetumisaeg ei ole muutunud. Uuritavad ained sisestatakse eraldi võimalikult väikestes kogustes (et vältida kolonni ülekoormust) ning nende peetumisajad määratakse kindlaks.

▼B

Määramiste usaldusväärsuse suurendamiseks tuleb need teha vähemalt kaks korda. Individuaalsetest mõõtmistest tuletatud log K_{oc} väärtused peaksid jääma vahemikku 0,25 logaritmiühikut.

1.8.4. **Hindamine**

Võimsustegurid k' arvutatakse valitud võrdlusainete surnud aja t_0 ja peetumisaegade t_R põhjal vastavalt võrrandile 4 (vt punkti 1.2). Seejärel joonistatakse graafik, milles võrdlusainete log k' andmed esitatakse liite tabelites 1 ja 3 toodud partii tasakaalustamise katsetest saadud vastavate log K_{oc} väärtuste funktsioonina. Selle graafiku abil kasutatakse uuritava aine log k' väärtust selle log K_{oc} väärtuse määramiseks. Kui tegelikud tulemused näitavad, et uuritava aine log K_{oc} on väljaspool kaliibrimisvahemikku, tuleks uuringut korrata, kasutades erinevaid, sobivamaid võrdlusaineid.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

Aruanne peab sisaldama järgmist teavet:

— uuritavate ainete ja võrdlusainete identsus ja puhtus ning vajaduse korral pK_a väärtused;

— seadmete ja tegevustingimuste kirjeldus, nt analüütilise (ja juht-) kolonni tüüp ja mõõtmed, tuvastamisvahendid, liikuv faas (komponentide suhe ja pH), temperatuuri vahemik määramiste jooksul;

— surnud aeg ja selle määramiseks kasutatud meetod;

— kolonni viidud uuritavate ainete ja võrdlusainete kogused;

— kaliibrimiseks kasutatud võrdlusühendite peetumisajad;

— joonestatud regressioonigraafiku (log k' *vs* log K_{oc}) üksikasjalikud andmed ja graafik ise;

— uuritud ühendi keskmised peetumisandmed ja määratud log K_{oc} väärtus;

— kromatogrammid.

3. **VIITED**

1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC Chemosphere, 17, 1 67.

3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050–1059.

4) C T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227–231.

5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297–312.

▼B

6) C T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831–832.

7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833–846.

8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121–128.

9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493–2504.

10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341–2352.

11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285–304.

12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373–1384.

▼B

liide

Tabel 1

Muldade ja reoveesette K_{oc} väärtuste ja HPLC-sõelumismeetodi alusel arvutatud väärtuste võrdlus ([1])/ ([2])

Aine	CASi nr	log K_{oc} reoveesete	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} mullad	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrasiin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuroon	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentioon	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuroon	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreen	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Bensoehappe fenüülester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Bensamiid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobensamiid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Atseetaniliid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniliin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dikloroaniliin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121-128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107-119.

Tabel 2

HPLC-meetodi tõhustamiseks ja valideerimiseks tehtud laboratooriumidevahelise võrdlusuuringu (11 laboratooriumi osalusel) tulemused ([1])

Aine	CASi nr	log K_{oc} (OECD 106)	K_{oc}	log K_{oc}
		[HPLC-meetod][	[HPLC-meetod]	
Atrasiin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuroon	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenool	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuroon	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fentioon	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

▼B

Tabel 3

Mulla adsorptsiooni käsitlevatel andmetel põhineva HPLC-sõelumismeetodi jaoks soovitatavad võrdlusained

Võrdlusained	CASi nr	Partii tasakaaluolekust saadud log K_{oc} keskmised väärtused	K_{oc} andmete number	log S.D.	Allikas
Atseetaniliid	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenool	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobensamiid	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N, N-dimetiiiilbensamiid	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-metüülbensamiid	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Metüülbensoaat	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrasiin	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturoon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-nitrobensamiid	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Aniliin	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-dinitrobensamiid	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Karbentasiim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenool	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triasoksiid	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triasofoss	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuroon	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftaleen	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfaandiool	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-triklorobenseen	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
y-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fentioon	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pürasofoss	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-endosulfaan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diklofop-metüül	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantreen	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (segu)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R&D Report No 106 01044 (1994)
(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.
(c) Tööstusest saadud andmed.

▼M7

C.20. HIIDKIIVRIKU (*DAPHNIA MAGNA*) SIGIVUSE KATSE

SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 211 (2012). OECD katsejuhendeid vaadatakse teaduse arengut arvestades korrapäraselt läbi. Sigivuse katsejuhend 211 pärineb katsejuhendi 202 II osast „*Daphnia* sp. sigivuse katse“ (1984). Oli üldiselt teada, et katsejuhendi nr 202 kohaselt läbiviidud katsete andmed võivad olla muutlikud. Seepärast tehti suuri jõupingutusi, et leida selle muutlikkuse põhjused ja luua parem katsemeetod. Katsejuhendi 211 aluseks on teadusuuringute tulemused, laboritevahelised võrdluskatsed ja valideerimisuuringud, mis tehti 1992. (1), 1994. (2) ja 2008. aastal (3).

Peamised erinevused sigivuskatse esialgsest versioonist (nr 202, 1984) ja teisest versioonist (nr 211, 1998) on järgmised:

— soovitatud kasutatav liik on *Daphnia magna*;

— katse kestab 21 päeva;

— poolstaatiliste katsete puhul kasutatavate loomade arvu on iga uuritava kontsentratsiooni puhul vähendatud vähemalt 40-lt, kes olid eelistatult jaotatud neljaks kümneloomaliseks rühmaks, 10 loomale, keda hoitakse eraldi (kuigi läbivoolukatsete puhul võib kasutada erinevaid katseplaane);

— katses kasutatava söötme ja söötmistingimuste kohta on esitatud konkreetsemaid soovitusi.

— Peamised erinevused sigivuskatse teise versiooni (nr 211, 1998) ja käesoleva versiooni vahel on järgmised:

— on lisatud liide 7, et kirjeldada meetodit vastsündinute soo määramiseks, kui seda nõutakse. Kooskõlas käesoleva katsemeetodi varasemate versioonidega on sooline jagunemine üks võimalikke määratavaid näitajaid;

— Sõltuvat muutujat „elusate järglaste arv ellujäänud vanema kohta“ on täiendatud veel ühe kiivrike paljunemist iseloomustava sõltuva muutujaga, nimelt „elusate järglaste üldarv katse lõpul ühe vanema kohta katse alguses“, kusjuures analüüsil ei võeta arvesse vanemate juhuslikku või seletamatut suremust. Sellise sõltuva muutuja lisamise eesmärk on viia see sõltuv muutuja kooskõlla muudes selgrootutega tehtavates sigivuskatsetes kasutatavate muutujatega. Peale selle on käesolevas katsemeetodis selle sõltuva muutuja puhul võimalik kõrvaldada üks veaallikatest, nimelt vanemloomade juhuslik või seletamatu suremus, kui see toimub kokkupuuteperioodi ajal;

— lisatud on täiendavaid statistilisi juhiseid katsete kavandamise ja andmete töötlemise kohta nii seoses ECx (nt EC10 või EC50) kui ka NOEC/LOEC (täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon) lähenemisviisiga;

— lisatud on piirsisalduskatse.

Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

Katse põhieesmärk on hinnata kemikaalide mõju *Daphnia magna* sigivusele. Selleks viiakse noored emased kiivrikud (vanemloomad), kes on katse alguses alla 24 tunni vanad, kokkupuutesse veele eri kontsentratsioonides lisatud uuritava kemikaaliga. Katse kestab 21 päeva. Katse lõpus hinnatakse elusate lisandunud järglaste koguarv. Vanemloomade sigivust saab väljendada ka muul viisil (nt looma kohta päevas saadud elusate järglaste arv alates esimesest päevast, mil järglaste olemasolu märgati), kuid need tuleb esitada lisaks katse lõpus elus

▼M7

olevate noorloomade koguarvule. Tänu muude selgrootutega tehtavate sigivuskatsetega võrreldes erilisele poolstaatilise katseplaanile, on võimalik määrata ka igalt üksikisendilt saadud elusate järglaste arv. See võimaldab, vastupidi muudele selgrootutega tehtavatele sigivuskatsetele, jätta analüüsist välja andmed sellise vanemlooma sigivuse kohta, kes katse ajal juhuslikel või seletamatutel põhjustel sureb. Seega, kui kemikaaliga kokkupuute paralleelkatsetes esineb vanemate suremust, tuleks kaaluda, kas suremuses on märgata kontsentratsiooni-toime sõltuvust, näiteks, kas esineb toime oluline regressioon, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooni positiivse tõusuga (selle määramiseks võib kasutada Cochran-Armitage'i trenditesti). Kui suremusega seoses ei esine kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleb need paralleelkatsed, milles esineb vanemate suremust, katsetulemuste analüüsist välja jätta. Kui suremuses on näha kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleks vanemloomade suremust hinnata kui uuritava kemikaali toimet ja selliseid paralleelkatseid ei tohiks analüüsist välja jätta. Kui vanem sureb katse ajal, st juhusliku (mingi käsitsemisvea või juhuse tõttu) või seletamatu vahejuhtumi tõttu, mis ei ole seotud uuritava kemikaali toimega, või kui vanem osutub isasloomaks, jäetakse see paralleelkatse analüüsist välja (vt lähemalt punkt 51). Uuritava kemikaali toksilised mõjud sigivusele väljendatakse ECx kujul, mille leidmiseks lähendatakse andmeid sobivale mudelile mittelineaarse regressiooniga, et leida kontsentratsioon, mis põhjustab loomade sigivuse vähenemise x %, või et alternatiivina leida NOEC/LOEC väärtus (4). *Eelistatavalt peaks uuritavate kontsentratsioonide vahemik asuma mõlemal pool toimet avaldavat väikseimat kasutatud kontsentratsiooni (nt EC_{10}), mis tähendab, et see väärtus arvutatakse interpoleerimisega, mitte ekstrapoleerimisega.*

Andmed tuleb esitada ka vanemate ellujäämise ja esimeste järglaste saamise aja kohta. Uurida võib ka muid kemikaaliga seotud toimeid sellistele näitajatele, nagu kasv (pikkus), ja võimaluse korral ka populatsiooni kasvu omakiirusele (vt punkt 44).

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

Akuutse toksilisuse katse tulemused (vt käesoleva lisa peatükk C.2. *Daphnia* sp. liikumisvõime akuutse pärssimise katse), kui katse on tehtud *Daphnia magna*'ga, võivad olla kasulikud sigivuskatse tegemiseks sobiva uuritavate kontsentratsioonide vahemiku valimiseks. Teada peavad olema uuritava kemikaali lahustuvus vees ja aururõhk ning olemas peab olema usaldusväärne analüütiline meetod, mille abil määrata kemikaali kogust uuritavas lahuses ning mille kohta on teada tulemuslikkus ja määramispiir.

Katsetingimuste kindlaksmääramisel võib olla kasulik järgmine uuritavat kemikaali käsitlev teave: struktuurivalem, kemikaali puhtus, stabiilsus valguse käes, stabiilsus katsetingimustes, pKa, P_{ow} ja biolagunduvuse katse tulemused (vt käesolevas lisas meetod C.4, kohese biolagunduvuse määramine, ja C.29, kiire biolagundatavus – CO_2 suletud nõudes).

KATSE NÕUETEKOHASUS

Katse nõuetekohasuse jaoks peavad kontrolli rühma(de)s olema täidetud järgmised kvaliteedikriteeriumid:

— vanemate (emaste kiivrike) suremus ei ületa katse lõpus 20 %;

— katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud elusate järglaste keskmine arv on $\geq$ 60.

Märkus: sama kriteeriumi (20 %) võib kasutada ka juhusliku ja seletamatu vanemate suremuse kohta nii kontrolli katsetes kui ka iga uuritava kontsentratsiooni puhul.

▼M7

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

Katsenõud ja muud seadmed, mis puutuvad kokku uuritavate lahustega, peavad olema üleni klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Katsenõud on tavaliselt klaasist keeduklaasid.

Lisaks võib vaja minna veel järgmisi vahendeid:

— hapnikumõõtur (mikroelektroodi või muu sobiva seadmega, mis võimaldaks mõõta lahustunud hapnikku väikese ruumalaga proovides);

— temperatuuri reguleerimiseks vajalikud seadmed;

— pH-meeter;

— seadmed vee kareduse määramiseks;

— seadmed vee orgaanilise süsiniku kogusisalduse määramiseks või seadmed keemilise hapnikutarbe määramiseks;

— sobivad seadmed valgusrežiimi reguleerimiseks ja valgustugevuse mõõtmiseks.

Katseorganism

Katses kasutatav liik on *Daphnia magna* Straus ([1]).

Eelistatavalt tuleks kloon identifitseerida genotüübi määramisega. Teadusuuringud (1) on näidanud, et klooni A (pärit IRCHAst Prantsusmaalt) (5) sigivuse puhul on nõuetekohasuse kriteerium – keskmiselt ≥ 60 järglast ellujäänud vanema kohta – järjekindlalt täidetud, kui kasvatamine toimub käesoleva meetodi tingimuste kohaselt. Vastuvõetav on ka muude kloonide kasutamine, kui tõendatakse, et kiivrike kultuur vastab katse nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Katse alguses ei tohiks loomad olla üle 24 tunni vanad ning nad ei tohiks olla esimese haudme järglased. Nad peavad olema pärit tervest põhikultuurist (st neil ei tohi esineda selliseid stressi tunnuseid nagu suur suremus, isaste ja talimunade esinemine, esimese haudme hilinemine, värvimuutusega loomad jne). Põhikultuuri loomi tuleks säilitada katsetingimustega sarnastes kasvatamistingimustes (valgus, temperatuur, sööde, söötmine ja loomade arv ruumalaühiku kohta). Kui katses kasutatav kiivrikute kasvatamise sööde erineb söötmest, mida tavaliselt kasutatakse kiivrikute kasvatamiseks, on hea tava kasutada vanemate stressi vältimiseks katse-eelset tavaliselt umbes kolme nädala pikkust (st üks põlvkond) aklimatiseerimisperioodi.

Katses kasutatav sööde

Kõnealuses katses on soovitatav kasutada täielikult määratletud koostisega söödet. See aitab vältida raskesti iseloomustatavate lisaainete (nt merevetikad, mullaekstraktid) kasutamist ja parandab seega laboritevahelise standardimise võimalusi. On leitud, et selleks otstarbeks sobivad söötmed on Elendti M4 (6) ja M7 söötmed (vt 2. liide). Eeldusel, et kiivrikukultuur tõendatult vastab katse nõuetekohasuse kriteeriumidele, on vastuvõetavad siiski ka muud söötmed (nt 7, 8).

([1]) Muid kiivrike liike võib kasutada tingimusel, et nad vastavad vajalikele katse nõuetekohasuse kriteeriumidele (kontrolli rühma sigivusega seotud nõuetekohasuse kriteerium peaks olema asjakohane kõikide kiivrikuliikide puhul). Kui kasutatakse muid kiivrike liike, tuleb nad selgelt identifitseerida ja nende kasutamine põhjendada.

▼M7

Kui kasutatakse määratlemata lisaaineid sisaldavat söödet, tuleb need lisaained selgelt määratleda ning katseprotokollis tuleb esitada teave koostise ja eriti süsinikusisalduse kohta, sest see võib täiendada pakutavat söödavalikut. Soovitatav on määrata orgaanilise lisaaine põhilahuse orgaanilise süsiniku kogusisaldus ja/või keemiline hapnikutarve ning hinnata sellest tulenev panus katseks valmistatud söötme orgaanilise süsiniku kogusisaldusse või keemilisse hapnikutarbesse. Soovitatakse veel, et söötme orgaanilise süsiniku kogusisalduse väärtused (enne vetikate lisamist) oleksid väiksemad kui 2 mg/l (9).

Kui uuringud tehakse metalle sisaldavate kemikaalidega, on oluline arvestada, et katseks kasutatud söötme omadused (nt karedus, kelaatimisvõime) võivad mõjutada uuritava kemikaali toksilisust. Seepärast on soovitav kasutada täpselt määratletud koostisega söödet. Praegu on ainsad täielikult määratletud koostisega söötmed, mis teadaolevalt sobivad *Daphnia magna* pikaajaliseks kultiveerimiseks, Elendti M4 ja M7 söötmed. Mõlemad söötmed sisaldavad kelaativat ainet EDTA. On näidatud (2), et kui sigivuskatse tehakse M4 ja M7 söötmes, on kaadmiumi „näiline toksilisus“ üldiselt väiksem kui söötme puhul, milles puudub EDTA. Seepärast ei soovitata M4 ja M7 kasutada uuringute tegemiseks metalle sisaldavate kemikaalidega ning vältida tuleks ka muid söötmeid, mis sisaldavad teadaolevaid kelaadimoodustajaid. Metalli sisaldavate kemikaalide puhul on soovitatav kasutada alternatiivset söödet, näiteks ASTMi taastatud karedat magevett (9), mis ei sisalda EDTA-d. Kõnealune ASTMi taastatud kareda magevee ja vetikaekstrakti (10) kombinatsioon sobib *Daphnia magna* pikaajaliseks kasvatamiseks (2).

Lahustunud hapniku kontsentratsioon peab olema üle 3 mg/l katse alguses ja kestel. pH peaks olema vahemikus 6–9 ning see ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui 1,5 ühikut. Soovitatav karedus on üle 140 mg/l (väljendatud $CaCO_3$-na). Kõnealusel tasemel tehtud katsete puhul on sigivus olnud vastavuses katse nõuetekohasuse kriteeriumidega (11, 12).

Katselahused

Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahused tuleks eelistatavalt valmistada lahusteid või dispergente kasutamata, kui see on võimalik, uuritava kemikaali segamise või loksutamisega katses kasutatavas söötmes, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid, nagu loksutamine, segamine või töötlemine ultraheliga või muid sobivaid meetodeid. On soovitatav, et enne katseloomade lisamist viiakse katsesüsteem kokkupuutesse uuritava kemikaali kontsentratsiooniga, mida katses kasutatakse, nii kauaks, kui on vaja selleks, et tõendada stabiilse kokkupuutekontsentratsiooni püsimist keskkonnas. Kui uuritav kemikaal on vees raskesti lahustuv, tuleb kasutada meetodeid, mida on kirjeldatud OECD juhenddokumendis raskesti uuritavate ainetega katsete tegemise kohta (13). Lahusti või dispergendi kasutamist tuleks vältida, kuid mõnel juhul võib see olla vajalik annustamiseks sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks.

Lisaks uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidega tehtavatele katsetele tuleb vajaliku arvu paralleelidega teha ka lahjendusvee kontrolli katse ja, kui lahusti kasutamist ei õnnestu vältida, siis vajaliku arvu paralleelidega ka lahusti kontrolli katse. Katses tuleks kasutada vaid selliseid lahusteid või dispergente, mida on uuritud ja mille kohta on näidatud, et neil ei ole olulist toimet või on vaid minimaalne toime sõltuvale muutujale. Sobivate lahustite (nt atsetoon, etanool,

▼M7

metanool, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool) ja dispergentide (näiteks Cremophor RH40, 0,01 % metüültselluloos ja HCO-40) näited on esitatud publikatsioonis (13). Kui kasutatakse lahustit või dispergenti, ei tohiks selle lõppkontsentratsioon ületada 0,1 ml/l (13) ning see kontsentratsioon peab olema ühesugune kõikides katsenõudes, välja arvatud lahjendusvee kontroll. Siiski tuleks teha kõik selleks, et lahusti kontsentratsioon oleks minimaalne.

KATSE KÄIK

Kokkupuutetingimused

Katse kestus

Katse kestab 21 päeva.

Katseloomade asustamistihedus

Vanemloomad asustatakse katsenõudesse ühekaupa; tavaliselt on katsenõus 50–100 ml söödet (*Daphnia magna* puhul; eriti väiksemate kiivrike, nt *Ceriodaphnia dubia* puhul võib olla võimalik kasutada ka väiksemat ruumala), välja arvatud juhul, kui katse on vaja korraldada läbivoolukatsena.

Vahel võib uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks kasutatava analüüsimeetodi nõuete täitmiseks kasutada suuremat ruumala, kuid lubatud on ka paralleelkatsete koondamine keemilise analüüsi tegemiseks. Kui kasutatava katsevedeliku ruumala on üle 100 ml, võib kiivrikutele antava sööda kogust suurendada, et tagada piisava sööda olemasolu ja vastavus katse nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Katseloomad

Poolstaatiliste katsete puhul vähemalt 10 eraldi peetavat looma iga uuritava kontsentratsiooni kohta ja vähemalt 10 eraldi peetavat looma kontrolli rühmas.

Läbivoolukatsete korral on osutunud sobivaks 40 looma kasutamine, kes on jagatud nelja kümneliikmelisse rühma iga uuritava kontsentratsiooni kohta (1). Kasutada võib ka väiksemat katsealuste organismide hulka ning soovitatav on kasutada kontsentratsiooni kohta vähemalt 20 looma, kes on jagatud kaheks või enamaks võrdse loomade arvuga paralleelkatseks (nt neli paralleelkatset, igas neist viis kiivrikut). Pange tähele, et kui loomi peetakse rühmadena, ei ole statistilisest analüüsist võimalik välja jätta ühtki järglast, kui seletamatu/juhuslik vanemate suremus esineb pärast sigimise algust; seepärast tuleb järglaste arv sellisel juhul avaldada elusate järglaste üldarvuna katse alguses olemas olnud vanemlooma kohta.

Uuritava aine jaotamine katsenõudesse ja katsenõude hilisem käitlemine peaks toimuma juhuslikul alusel. Kui nii ei tehta, võib see põhjustada tulemustes nihke, mida võib tõlgendada kontsentratsiooni mõjuna. Eelkõige juhul, kui katseühikuid käideldakse uuritava kemikaali manustamise või kontsentratsiooni järjekorras, võib mõni ajaga seotud tegur, näiteks uuringu läbiviija väsimus või muu viga, põhjustada suurema kontsentratsiooni korral tugevamat mõju. Kui katse tulemusi võivad mõjutada tingimused katse alguses või keskkonnatingimused, näiteks asukoht laboris, tuleks kaaluda katse katkestamist.

Söötmine

Poolstaatiliste katsete puhul peaks kiivrikke söötma iga päev ning soovitatavalt vähemalt kolm korda nädalas (st vastavalt söötme vahetustele). Arvesse tuleks võtta kokkupuutekontsentratsiooni võimalikku lahjenemist sööda lisamise tõttu; seda tuleks vältida niipalju kui võimalik ja selleks peab lisatav vetikate suspensioon olema hästi kontsentreeritud. Kõrvalekalletest (nt läbivoolukatsete korral) tuleb teatada.

Katse jooksul peaksid vanemate söödavaliku moodustama peamiselt ühe või mitme järgmise vetikaliigi elusad rakud: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (varasem nimetus *Selenastrum capricornutum*) ja *Desmodesmus subspicatus* (varasem nimetus *Scenedesmus subspicatus*). Söödavaliku aluseks

▼M7

on igale vanemale pakutava orgaanilise süsiniku (C) kogus. Teadusuuringud (14) on näidanud, et hiidkiivrikute puhul on söödaratsioon 0,1–0,2 mg süsinikku kiivriku kohta päevas piisav, et saada katse nõuetekohasuse kriteeriumide täitmiseks vajalik arv järglasi. Sööta võib anda püsikogusena kogu katseperioodi jooksul või soovi korral võib alguses kasutada väiksemat kogust, mida siis katse käigus suurendatakse, et võtta arvesse vanemloomade kasvamist. Sellisel juhul peaks sööda kogus jääma siiski soovitatavasse vahemikku 0,1–0,2 mg süsinikku kiivriku kohta päevas kogu katse vältel.

Kui nõutava koguse söötmisel kasutatakse asendusnäitajaid, näiteks vetikarakkude arvu või valguse neeldumist (näiteks lihtsustamise huvides, kuna süsinikusisalduse mõõtmine on aeganõudev), peab iga labor koostama oma nomogrammi, millelt oleks näha asendusnäitaja ja vetikakultuuri süsinikusisalduse seos (vt nõuanded nomogrammi koostamise kohta, 3. liide). Nomogramme tuleks kontrollida vähemalt kord aastas ja juhul, kui vetikakultuuri tingimused on muutunud, siis sagedamini. On leitud, et süsinikusisalduse puhul on parem kasutada valguse neeldumist kui rakkude arvu (15).

Selleks, et minimeerida vetikakultuuri söötme sattumine katsenõudesse, tuleks kiivrikuid sööta kontsentreeritud vetikasuspensiooniga. Vetikaid saab kontsentreerida tsentrifuugimisega, millele järgneb resuspendeerimine kiivrikute söötmes.

Valgus

16 tundi valgust, mille intensiivsus ei ole suurem kui 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, mõõdetuna katsenõu veepinnal. Luksides kaliibritud fotomeetri puhul vastab külmvalge valguse intensiivsuse vahemikule 15–20 µE·m-2·s-1 vahemik 1 000–1 500 luksi.

Temperatuur

Katses kasutatava söötme temperatuur peab olema vahemikus 18–22 °C. Ühe individuaalse katse puhul ei tohiks temperatuur ühe päeva jooksul nimetatud piirides võimaluse korral siiski kõikuda rohkem kui 2 °C (st 18–20, 19–21 või 20–22 °C). Temperatuuri jälgimiseks võib olla otstarbekas kasutada täiendavat katsenõu.

Aereerimine

Katsenõusid ei aereerita katse käigus.

Katseplaan

Vahemiku määramise katse

Vajaduse korral tehakse doosivahemiku leidmise katse, näiteks uuritava kemikaali viie kontsentratsiooniga ja kahe paralleeliga iga kokkupuutekatse või kontrolli katse kohta. Täiendav teave kiivrike ja/või muude veeorganismide suremuse või paljunemise kohta kas sarnaste kemikaalidega tehtud akuutse toksilisuse katsetest või kirjandusest võib aidata teha otsust doosivahemiku määramise katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kohta.

Doosivahemiku määramise katse kestab 21 päeva või nii kaua, kuni toime tugevust saab prognoosida piisava usaldusväärsusega. Katse lõpus hinnatakse kiivrike sigivust. Tuleb registreerida vanemate arv ja järglaste esinemine.

Lõplik katse

Tavaliselt tuleks kasutada vähemalt viit uuritavat kontsentratsiooni geomeetrilises jadas, mille eraldustegur ei tohiks soovitatavalt olla suurem kui 3,2 ja mis asuksid mõlemal pool toimet avaldavat kontsentratsiooni (nt EC_x). Iga uuritava kontsentratsiooniga tuleks teha asjakohane arv paralleelkatseid (vt punktid 24–25). Vähem kui viie kontsentratsiooni kasutamist tuleb põhjendada. Kemikaale ei

▼M7

tohiks uurida kontsentratsioonil, mis on suurem kui nende lahustuvus katsekeskkonnas. Enne katse tegemist soovitatakse kaaluda katseplaani statistilist võimsust ja sobivate statistiliste meetodite kasutamist (4). Kontsentratsioonivahemike valimisel tuleks meeles pidada järgmist:

i) kui hinnatakse sigivusega seotud EC_x väärtust, on soovitatav kasutada kontsentratsioone, mis oleksid piisavad, et määratleda EC_x vajalikul usaldusväärsuse tasemel. Katses kasutatavad kontsentratsioonid peaksid soovitatavalt asuma mõlemal pool hinnangulist EC_x väärtust, nii et EC_x leitaks interpoleerimisega, mitte ekstrapoleerimisega. Edasise statistilise analüüsi seisukohast on eeliseks, kui on kasutatud suuremat arvu kontsentratsioone (nt kümmet) ja vähem paralleelkatseid igal kontsentratsioonil (nt viit, millega katsenõude üldarv hoitakse konstantsena) ning kümmet kontrolli;

ii) LOEC ja NOEC määramisel peaks vähim kontsentratsioon olema piisavalt väike, et sigivus sellel kontsentratsioonil ei oleks oluliselt väiksem kui kontrolli rühmas. Vastupidisel juhul tuleb katset korrata vähendatud vähima kontsentratsiooniga;

iii) LOEC ja NOEC määramisel peaks suurim uuritav kontsentratsioon olema piisavalt suur, et sigivus sellel kontsentratsioonil oleks oluliselt väiksem kui kontrolli rühmas. Vastupidisel juhul tuleb katset korrata suurendatud suurima kontsentratsiooniga, välja arvatud juhul, kui esialgses katses kasutati suurima uuritava kontsentratsioonina suurimat kroonilise mõju uurimisel nõutavat uuritavat kontsentratsiooni (s.t 10 mg/l).

Kui doosivahemiku määramise katses ei täheldata (nt kontsentratsioonil 10 mg/l) mitte mingit mõju või kui on väga tõenäoline, et uuritav kemikaal on vähese toksilisusega või üldse mitte toksiline, arvestades toksilise mõju puudumist muudele organismidele ja/või vähest omastamist (või ei omastata seda üldse), võib sigivuskatse teha piirsisalduskatsena, kasutades näiteks uuritava kemikaali kontsentratsiooni 10 mg/l ja kontrolli. Nii kokkupuuterühmas kui ka kontrolli rühmas on vaja teha kümme paralleelkatset. Kui piirsisalduskatse tuleb teha läbivoolusüsteemis, siis piisab väiksemast arvust paralleelidest. Piirsisalduskatse võimaldab tõendada, et piirsisalduse juures puudub kemikaalil statistiliselt oluline toime; samas, kui täheldatakse mingit toimet, on tavaliselt vaja teha täielik katse.

Kontrollid

Lisaks katseseeriatele tuleb teha üks katses kasutatud söötme kontrolli katsete seeria ja vajaduse korral ka üks lahustit või dispergenti sisaldava kontrolli katsete seeria. Lahusti või dispergendi kasutamise korral peab nende kontsentratsioon olema sama kui uuritavat kemikaali sisaldavates nõudes. Kasutada tuleks asjakohast arvu paralleelkatseid (vt punktid 23–24).

Tavaliselt peaks korralikult läbiviidud katse puhul olema kontrolli rühmas (rühmades) vanema kohta saadud elus järglaste keskmise arvu variatsioonikordaja $\leq$ 25 % ning see tuleb esitada katseplaani puhul, milles kasutatakse üksikult peetavaid loomi.

Söötme uuendamine

Söötme uuendamise sagedus sõltub uuritava kemikaali stabiilsusest, kuid see sagedus peaks olema vähemalt kolm korda nädalas. Kui stabiilsuse eelkatses (vt punkt 7) ilmneb, et maksimaalse uuendamisperioodi (st kolme päeva) jooksul ei ole uuritava kemikaali kontsentratsioon püsiv (st väljaspool vahemikku 80–120 % või väiksem kui 80 % esialgsest mõõdetud kontsentratsioonist), tuleks kaaluda katses kasutatava söötme sagedamat uuendamist või kasutada läbivoolukatset.

▼M7

Kui söödet uuendatakse poolstaatiliste katsete puhul, valmistatakse ette teine seeria katsenõusid ning vanemad teisaldatakse nendesse näiteks sobiva läbimõõduga klaaspipeti abil. Koos kiivrikuga teisaldatava söötme kogus peaks olema minimaalne.

Vaatlus

Katse jooksul tehtud vaatluste tulemused tuleb registreerida andmelehtedele (vt näidised, 4. ja 5. liide). Kui on vaja teha muid määramisi (vt punkt 44), võib vajalikuks osutuda täiendavate vaatluste tegemine.

Järglased

Iga vanema järglased tuleb pärast esimese haudme ilmumist eelistatavalt iga päev eemaldada ja üle lugeda, et nad ei saaks ära süüa vanemloomale ettenähtud sööta. Käesoleva katsemeetodi puhul tuleb üle lugeda ainult elusad järglased, kuid registreerida tuleb ka aborteerunud munad ja surnud järglased.

Suremus

Vanemate suremus tuleks registreerida soovitatavalt kord päevas või vähemalt niisama sageli kui loendatakse järglasi.

Muud parameetrid

Kuigi selle meetodi põhieesmärk on hinnata mõju järglaste arvule, on võimalik, et ka muid toimeid õnnestub piisavalt hästi kvantitatiivselt mõõta, selleks et neid statistiliselt analüüsida. Katses võib registreerida järglaste arvu iga ellujäänud vanema kohta, st kogu katseperioodi jooksul ellujäänud vanemalt saadud elusate järglaste arvu. Seda võib võrrelda peamise sõltuva muutujaga (järglaste arv iga sellise vanema kohta katse alguses, kes ei ole juhuslikult või seletamatult surnud katse ajal). Kui kemikaaliga kokkupuute paralleelkatsetes esineb vanemate suremust, tuleks kaaluda, kas suremuses on märgata kontsentratsiooni-toime sõltuvust, näiteks, kas esineb toime oluline regressioon, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooni positiivse tõusuga (selle määramiseks võib kasutada Cochran-Armitage'i trenditesti). Kui suremusega seoses ei esine kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleb need paralleelkatsed, milles esineb vanemate suremust, katsetulemuste analüüsist välja jätta. Kui suremuses esineb kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleks vanemloomade surma pidada uuritava kemikaali toimeks ja selliseid paralleelkatseid ei tohiks katsetulemuste analüüsist välja jätta. Väga soovitatav on kasvu iseloomustavate andmete kogumine, sest see annaks teavet võimalike subletaalsete mõjude kohta, mis võivad olla kasulikud ja täiendada ainult sigivust käsitlevate mõõtmiste tulemusi; katse lõpus on soovitatav mõõta vanemate pikkus (st kehapikkus, v.a anaaloga). Lisaks sellele võib mõõta või arvutada veel järgmised parameetrid: aeg esimese haudme (ja sellele järgnevate haudmete) saamiseni, haudmete arv ja suurus looma kohta, aborteerunud haudmete arv, isaste noorjärkude (OECD, 2008) ja talimunade esinemine ning võimaluse korral populatsiooni kasvu omakiirus (vt mõisted, 1. liide, ja noorjärkude soo määramine, 7. liide).

Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus

Värske ja vana söötme hapnikusisaldust, temperatuuri, vee karedust ja pH-väärtusi tuleb mõõta vähemalt kord nädalas, kontrolli rühmas (rühmades) ja uuritava kemikaali suurima kontsentratsiooniga katsenõus.

Katse käigus määratakse uuritava kemikaali kontsentratsiooni korrapäraste ajavahemike järel.

Poolstaatiliste katsete puhul, kui võib eeldada, et uuritava kemikaali kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest (st vahemikku 80–120 %; vt punktid 6, 7 ja 39), on soovitatav analüüsida vähemalt vähimat ja suurimat uuritavat kontsentratsiooni vahetult pärast valmistamist ja uuendamise ajal üks

▼M7

kord esimese nädala jooksul (st analüüsida tuleb proovi, mis on võetud samast lahusest – kohe pärast valmistamist ja uuendamise ajal). Hiljem tuleks nimetatud määramisi korrata vähemalt iga nädala järel.

Kui katsete puhul ei eeldata, et uuritava kemikaali kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest, tuleb analüüsida kõiki uuritavaid kontsentratsioone vahetult pärast valmistamist ja uuendamise ajal. Kui tegemist on katsega, mille puhul esialgne mõõdetud uuritava kemikaali kontsentratsioon ei jää vahemikku ± 20 % nimiväärtusest, kuid esitatakse piisavalt tõendeid selle kohta, et esialgsed kontsentratsioonid on korratavad ja püsivad (st jäävad vahemikku 80–120 % esialgsest kontsentratsioonist), võib katse teisel ja kolmandal nädalal keemilisi määramisi siiski vähendada ja piirduda vaid suurima ja vähima uuritava kontsentratsiooni analüüsimisega. Igal juhul tuleb enne uuendamist määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon ainult ühes paralleelkatset sisaldavas nõus iga uuritava kontsentratsiooni kohta.

Kui kasutatakse läbivoolukatset, on otstarbekas kasutada samasugust proovivõtukorda nagu poolstaatiliste katsete puhul kirjeldatud (kuid sellisel juhul ei ole võimalik mõõta „vanu“ lahuseid). Siiski võib olla soovitatav suurendada proovivõttude arvu esimesel nädalal (nt kolm mõõtmist), et veenduda uuritava kontsentratsiooni püsivuses. Seda tüüpi katsete puhul tuleks lahjendusvedeliku ja uuritava kemikaali voolukiirust kontrollida iga päev.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsioon on kogu katse vältel püsinud rahuldavalt vahemikus ± 20 % nimiväärtusest või esialgu mõõdetud kontsentratsioonist, võivad tulemused põhineda nimiväärtusel või esialgu mõõdetud väärtusel. Kui kõrvalekaldumine nimiväärtusest või esialgu mõõdetud kontsentratsioonist on suurem kui ± 20 %, tuleks tulemused esitada ajaga kaalutud keskmistena (vt arvutamisjuhendid, 6. liide).

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju sigivusele. Iga katsenõu (st iga paralleelkatse) kohta tuleb arvutada vanema kohta saadud järglaste koguarv. Lisaks võib sigivuse arvutada ellujäänud vanemalt saadud elusate järglaste arvu järgi. Ökoloogiliselt kõige asjakohasem mõju näitaja on siiski selliselt vanemalt saadud elusate järglaste üldarv, kes ei sure katse ajal juhuslikult ([1]) või seletamatult ([2]). Kui vanem sureb katse ajal juhuslikult või seletamatult või osutub isasloomaks, jäetakse see paralleelkatse analüüsist välja. Analüüsi aluseks võetakse sel juhul väiksem arv paralleelkatseid. Kui kemikaaliga kokkupuute paralleelkatsetes esineb vanemate suremust, tuleks kaaluda, kas suremuses on märgata kontsentratsiooni-toime sõltuvust, näiteks, kas esineb toime oluline regressioon, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooni positiivse tõusuga (selle määramiseks võib kasutada Cochran-Armitage'i trenditesti). Kui suremusega seoses ei esine kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleb need paralleelkatsed, milles esineb vanemate suremust, katsetulemuste analüüsist välja jätta. Kui suremuses esineb kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleks vanemloomade surma pidada uuritava kemikaali toimeks ja selliseid paralleelkatseid ei tohiks katsetulemuste analüüsist välja jätta.

Lühidalt, kui mõju väljendamiseks kasutatakse LOEC, NOEC või EC_x väärtusi, on soovitatav arvutada mõju sigivusele, kasutades mõlemat eespool nimetatud sõltuvat muutujat, nimelt

([1]) Juhuslik suremus: suremus kemikaaliga mitte seotud juhuste tõttu (st põhjus on teada).
([2]) Seletamatu suremus: kemikaaliga mitte seotud suremus, mille põhjus ei ole teada.

▼M7

— selliselt vanemalt saadud elusate järglaste üldarv, kes ei ole katse ajal surnud juhuslikult või seletamatult, ja

— elusate järglaste arv ellujäänud vanemlooma kohta,

ning kasutada seejärel lõpptulemusena väikseimat LOEC ja NOEC või EC_x väärtust, mis on arvutatud nendest kahest sõltuvast muutujast ühe põhjal.

Enne statistilist analüüsi, nt ANOVA analüüsi, kokkupuutekatsete võrdlemist kontrolli katsetega Studenti t-testi, Dunnetti testi või Williamsi testi abil või sammuviisilise muutujate elimineerimise Jonckheere'i-Terpstra testi astmelise rakendamisega, soovitatakse kaaluda andmete teisendamist, kui see on vajalik konkreetse statistilise testi nõuete täitmiseks. Mitteparameetriliste alternatiividena võib kaaluda Dunni või Manni-Whitney testi kasutamist. Üksikute kontsentratsioonitasemete keskväärtuste jaoks arvutatakse 95 % usaldusvahemikud.

Ellujäänud vanemloomade arv kemikaaliga mõjutamata kontrolli rühmades on üks peamisi katse nõuetekohasuse kriteeriume; see tuleb dokumenteerida ja esitada katseprotokollis. Lõpparuandes tuleb esitada ka kõik muud ilmnenud kahjulikud mõjud, nagu ebaharilik käitumine ja olulised toksikoloogilised nähud.

ECx

EC_x väärtused koos nende 95 % usaldusvahemiku ülemise ja alumise piiriga arvutatakse asjakohaste statistiliste meetoditega (nt logistiline või Weibulli funktsioon, Spearmani-Kärberi kohendatud meetod või lihtne interpolatsioon). EC_{10}, EC_{50} või mõne muu EC_x arvutamiseks tuleb kõiki andmeid töödelda regressioonanalüüsiga.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC)

Kui statistilise analüüsi eesmärk on määrata täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon, tuleb kasutada sobivaid statistilisi meetodeid vastavalt OECD dokumendile 54, vt „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“ („Praegused meetodid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks: rakendamissuunised“) (4). Üldiselt otsitakse andmetest uuritava kemikaali negatiivset mõju, võrreldes kontrolli rühmaga, kasutades selleks ühepoolse hüpoteesi testimist $p \leq 0,05$ juures.

Normaaljaotuse olemasolu ja dispersiooni homogeensust võib kontrollida asjakohase statistilise testiga, nt Shapiro-Wilki testi ja Levene'i testiga ($p \leq 0,05$). Võib teha ühepoolse dispersioonanalüüsi (ANOVA) ja seejärel mitmese võrdluse teste. Mitmeseid võrdlusi (nt Dunnetti test) või sammuviisilise muutujate elimineerimise trendi teste (nt Williamsi test või astmeline Jonckheere'i-Terpstra test) saab kasutada selleks, et arvutada, kas esineb olulisi erinevusi ($p \leq 0,05$) kontrolli rühmade ja uuritava kemikaali eri kontsentratsioonide vahel (soovitatav test valitakse vastavalt OECD dokumendile nr 54 (4)). Teiselt poolt võib NOEC ja LOEC määramiseks kasutada mitteparameetrilisi meetodeid (nt Bonferroni U-testi vastavalt Holmi või Jonckheere'i-Terpstra trenditestile).

Piirsisalduskatse

Kui on tehtud piirsisalduskatse (kontrolli rühma võrdlemine ainult ühe kontsentratsiooni katserühmaga) ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeensus) on täidetud, võib arvulise tulemuse analüüsimiseks kasutada Studenti t-testi. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testi (Welchi t-test) või mitteparameetrilist testi, näiteks Manni-Whitney U-testi.

Kontrolli rühmade (lahustita ja lahustiga või dispergendiga kontrolli katsete) vaheliste oluliste erinevuste kindlakstegemiseks võib kummagi kontrollirühma paralleelkatseid analüüsida piirsisalduskatse puhul kirjeldatud viisil. Kui kõnealuste testidega ei tuvastata olulisi erinevusi, võib kõikide lahustita ja lahustiga kontrolli paralleelkatsete andmed ühte koondada. Vastasel juhul tuleks kõikide katserühmade andmeid võrrelda lahustiga kontrolli katsete andmetega.

▼M7

Katseprotokoll

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline olemus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— keemiline iseloomustus, kaasa arvatud puhtusaste.

Katseorganismi liik:

— kloon (kas genotüüp on määratud), tarnija või päritolu (kui on teada) ja kasutatud kultiveerimistingimused. Kui kasutatakse muud hiidkiivriku liiki, tuleks see ära märkida ja seda põhjendada.

Katsetingimused:

— kasutatud katsemeetod (nt poolstaatiline või läbivoolukatse, ruumala, kiivrikute arv liitri kohta);

— fotoperiood ja valgustugevus;

— katseplaan (nt paralleelkatsete arv, vanemate arv paralleelkatse kohta);

— andmed kasutatud söötme kohta;

— vajaduse korral kasutatud orgaanilised lisaained, sh koostis, päritolu, valmistusmeetod, põhilahuse orgaanilise süsiniku kogusisaldus / keemiline hapnikutarve, sellest tulenev söötme orgaanilise süsiniku kogusisalduse / keemilise hapnikutarbe hinnang;

— üksikasjalikud andmed söötmise kohta, sealhulgas kogus (mg C kiivriku kohta päevas) ja ajakava (nt sööda (söötade) liik, sh vetikate puhul konkreetne (liigi) nimi ja võimaluse korral ka liin, kasvatamistingimused);

— põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamissagedus (kui kasutatakse lahustit või dispergenti, tuleks esitada selle nimi ja kontsentratsioon).

Katsetulemused:

— uuritava kemikaali stabiilsuse esialgsete uuringute tulemused;

— nominaalsed uuritavad kontsentratsioonid ja kõigi analüüside tulemused, mis on tehtud katsenõudes oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks (vt andmelehtede näidised, 5. liide); esitada tuleks ka meetodi tulemuslikkus ja määramispiir;

— katsenõudes oleva vee kvaliteet (st pH, temperatuur ja lahustunud hapniku sisaldus, orgaanilise süsiniku kogusisaldus ja/või keemiline hapnikutarve ja vajaduse korral vee karedus) (vt andmelehe näidis, 4. liide);

— täielikud andmed katse käigus igalt vanemalt saadud elusate järglaste kohta (vt andmelehe näidis, 4. liide);

— vanemate surmajuhtude arv ja surmapäev (vt andmelehe näidis, 4. liide);

— kontrolli rühma järglaste arvu variatsioonikordaja (katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud elus järglaste koguarvu põhjal);

— graafik elusate järglaste arvu kohta igas paralleelkatses, välja arvatud emasloomad, kes on katse ajal surnud juhuslikult või seletamatult, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga;

▼M7

— sobivas teljestikus graafik elusate järglaste üldarvu kohta igas paralleelproovis ellujäänud emaslooma kohta, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga;

— võimaluse korral vähim sigivusele täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC), sh kasutatud statistiliste meetodite kirjeldus ja märge selle kohta, kui suurt mõju võis eeldada (enne selle määramiseks korraldatavat katset võib teha statistilise võimsuse analüüsi), ning sigivusele täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC); teave selle kohta, millist sõltuvat muutujat kasutati LOEC ja NOEC väärtuste arvutamiseks (kas elusate järglaste arv emaslooma kohta, kes ei surnud juhuslikult või seletamatult, või elusate järglaste üldarv iga elusoleva emaslooma kohta); kui asjakohane, tuleb esitada ka emasloomade suremuse LOEC ja NOEC;

— vajaduse korral sigivuse EC_x ja usaldusvahemikud (näiteks 90 % ja 95 %) ning graafik, millele on kantud andmetega sobitatud mudel, mida kasutati selle arvutamiseks, kontsentratsiooni-reaktsiooni sõltuvuse kõvera tõus ja selle standardviga;

— muud täheldatud bioloogilised mõjud või mõõtmised; tuleb esitada andmed kõigi täheldatud või mõõdetud bioloogiliste mõjude kohta (nt vanemate kasv) koos võimalike asjakohaste põhjendustega;

— selgitused kõigi katsemeetodist kõrvalekaldumiste kohta.

KIRJANDUS

(1) OECD Test Guidelines Programme. „Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test“, Sheffield University, U.K., 20.–21. märts 1993.

(2) OECD (1997). „Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test“. *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* No.6. OECD, Paris.

(3) OECD (2008). „Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test“. *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* No.88. OECD, Paris.

(4) OECD (2006). „Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application“. *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54.* OECD, Paris.

(5) Baird, D.J. *et al*. (1991). „A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus“. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, 257–265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). „Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus“. *Protoplasma* 154: 25–33.

(7) EPA (2002). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). „Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*“. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775–782.

(9) ASTM, (2008), „Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians“. In: *Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology*, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

(10) Baird, D.J. *et al*. (1989). „The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects“. In: *Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology*. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen Eds.) pp 144–148.

▼**M7**

(11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte, and G.P. Wright (1981) „Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*“. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol*., 26: 1–8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990), „The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness“, *Arch. Hydrobiol*., 120(2): 185-196.

(13) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23*. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson and D. Holmes (1993), „Toward a standard *Daphnia* juvenile production test“. *Environ. Toxicol. and Chem*., 12, 2053–2058.

(15) Sims, I. (1993). „Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth“. *Arch. Hydrobiol*., 128, 459–466.

▼M7

1. liide

MÕISTED

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Avastamispiir – vähim kontsentratsioon, mille olemasolu on võimalik määrata, kuid mille suurust ei saa kvantitatiivselt mõõta.

Ecx – vees lahustatud uuritava aine kontsentratsioon, mille juures kiivrike sigivus väheneb kokkupuuteaja jooksul x %.

Juhuslik suremus – suremus kemikaaliga mitte seotud juhuste tõttu (st põhjus on teada).

Järglane – noor kiivrik, kes on saadud vanemloomalt katse jooksul.

Kemikaal – aine või segu.

Määramispiir – vähim kontsentratsioon, mille suuruse saab kvantitatiivselt mõõta.

Populatsiooni kasvu omakiirus – populatsiooni kasvu määr, milles on ühendatud sigivus ja east tingitud suremus (1–3). Stabiilsetes populatsioonides on see null. Kasvavate populatsioonide puhul on see positiivne ja kahanevate populatsioonide puhul negatiivne. Kahanevad populatsioonid ei ole ilmselt jätkusuutlikud ja surevad lõpuks välja.

Seletamatu suremus – kemikaaliga mitte seotud suremus, mille põhjus ei ole teada.

Sigivus – vanemloomadelt katse ajal saadud elusate järglaste arv.

Suremus – loom registreeritakse surnuna, kui ta ei liiguta, st ei suuda ujuda, või kui 15 sekundit pärast katsenõu ettevaatlikku loksutamist ei ole võimalik täheldada tundlate ja tagakeha liikumist. (Kui kasutatakse teistsugust määratlust, tuleb see esitada koos vajalike viidetega.)

Täheldatavat toimet mitte avaldav kontsentratsioon (NOEC) – esimene LOECst väiksem uuritud kontsentratsioon, millel teatatud kokkupuuteaja jooksul ei avaldu kontrolli rühmaga võrreldes statistiliselt olulist mõju ($p < 0,05$ juures).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Vanemloom – katse alguses katses olnud emane kiivrik, kelle sigivuse uurimine on katse eesmärk.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) – vähim uuritud kontsentratsioon, mille puhul ainel on teatatud kokkupuuteaja jooksul kontrolli rühmaga võrreldes statistiliselt oluline ($p < 0,05$ juures) mõju sigivusele ja vanemate suremusele. Kõikidel LOECst suurematel uuritavatel kontsentratsioonidel peaks avalduma kahjulik mõju, mis on võrdne või suurem kui LOECi korral täheldatav mõju. Kui neid kaht tingimust ei ole võimalik täita, tuleb esitada täielik selgitus, kuidas LOEC (ja sellest tulenevalt ka NOEC) on valitud.

Kirjandus

(1) Wilson, E.O. ja Bossert, W.H. (1971), *A Primer of Population Biology*. A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼**M7**

(2) Poole, R.W. (1974), „An Introduction to quantitative Ecology“. *McGraw-Hill Series in Population Biology*, New York, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. ja Boyce, M.S. (1986), „Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques“. *Ecology*, 67, 1156–1166.

▼M7

2. liide

TÄIELIKULT MÄÄRATLETUD ELENDTI M7 JA M4 SÖÖTMETE VALMISTAMINE

Kohanemine Elendti söötmetega M7 ja M4

Mõnes laboris on olnud raskusi kiivrike üleviimisega otse söötmesse M4 (1) ja M7. Teatavat edu on siiski saavutatud järkjärgulise aklimatiseerimisega, st viimisega oma söötmest 30 % Elendti söödet sisaldavasse söötmesse, seejärel 60 % ja siis 100 % Elendti söödet sisaldavasse söötmesse. Kohanemisaeg võib kesta kuni kuu aega.

Valmistamine

Mikroelemendid

Kõigepealt valmistatakse sobiva puhtusastmega vees, nt deioniseeritud, destilleeritud või pöördosmoosi teel puhastatud vees, individuaalsete mikroelementide eraldi põhilahused (I). Nendest eri põhilahustest (I) valmistatakse üks põhilahus (II), mis sisaldab kõiki mikroelemente (kombineeritud lahus), st:

Põhilahused I (üks aine)	Vette lisatav kogus	Kontsentratsioon (söötmes M4)	Kombineeritud põhilahuse II valmistamiseks lisada veele järgmine kogus põhilahust I	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000-kordne	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	7 210-kordne	20 000-kordne	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-kordne	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-kordne	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	3 040	20 000-kordne	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-kordne	1,0	0,25
$MoNa_2O_4 \cdot 2H_2O$	1 260	20 000-kordne	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	335	20 000-kordne	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-kordne	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200	20 000-kordne	1,0	1,0
Kl	65	20 000-kordne	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-kordne	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-kordne	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	5 000	2 000-kordne	—	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1 991	2 000-kordne	—	—
Nii Na_2EDTA kui ka $FeSO_4$ lahused valmistatakse eraldi, valatakse kokku ja autoklaavitakse kohe. Tulemuseks saadakse:				
Fe-EDTA lahus		1 000-kordne	20,0	5,0

▼**M7**

Söötmed M4 ja M7

Söötmete M4 ja M7 valmistamiseks kasutatakse põhilahust II, makroelemente ja vitamiine järgmiselt:

	Vette lisatav kogus	Kontsentratsioon (söötmes M4)	Söötme valmistamiseks lisatud põhilahuse kogus	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
Põhilahus II (ühendatud mikro-elemendid)		20-kordne	50	50
Makrotoitainete põhila-hused (üks aine)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1 000-kordne	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-kordne	0,5	0,5
KC1	58 000	10 000-kordne	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-kordne	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-kordne	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-kordne	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-kordne	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-kordne	0,1	0,1
Vitamiinide ühendatud põhilahus	—	10 000-kordne	0,1	0,1

Vitamiinide ühendatud põhilahuse valmistamiseks lisatakse 3 vitamiini 1 liitrile veele järgmiselt:

	mg/l			
Tiamiinvesinikkloriid	750	10 000-kordne		
Tsüanokobalamiin (B_{12})	10	10 000-kordne		
Biotiin	7,5	10 000-kordne		

Vitamiinide ühendatud põhilahust säilitatakse külmutatuna väikestes alikvootides. Vitamiinid lisatakse söötmele vahetult enne kasutamist.

N.B.: Soolade sadestumise vältimiseks lisatakse täieliku söötme valmistamisel põhilahuste alikvoodid umbes 500–800 ml deioniseeritud veele ja seejärel lisatakse vett kuni 1 liitrini.

N.N.B. Esimese söödet M4 käsitleva uuringu võib leida artiklist Elendt, B.P. (1990), „Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus“. *Protoplasma* 154: 25–33.

▼M7

3. liide

ORGAANILISE SÜSINIKU KOGUSISALDUSE ANALÜÜS JA VETIKATEL PÕHINEVA SÖÖDA JAOKS ORGAANILISE SÜSINIKU KOGUSISALDUSE NOMOGRAMMI KOOSTAMINE

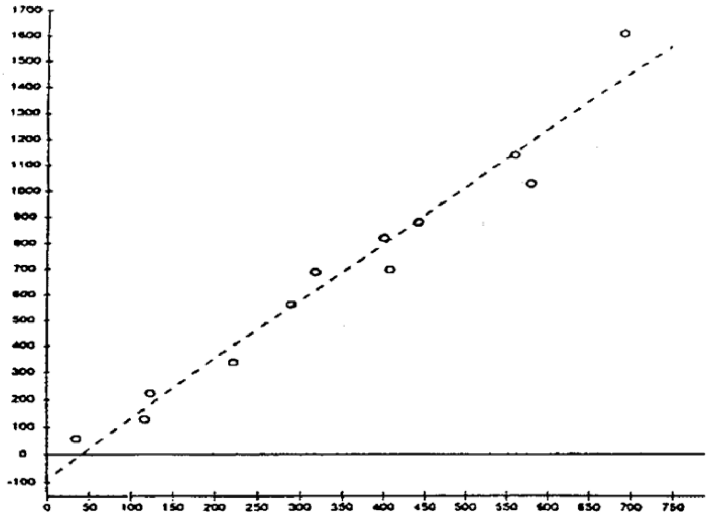
On teada, et vetikatel põhineva sööda süsinikusisaldust ei mõõdeta tavaliselt otse, vaid asendusparameetrite mõõtmistest (nt vetikarakkude arv või valguse neelduvus) tulenevate korrelatsioonide (st nomogrammi) põhjal.

Orgaanilise süsiniku kogusisaldust tuleks mõõta pigem kõrgel temperatuuril toimuva oksüdatsiooni kui UV- või persulfaatmeetodiga. (Nõuanded vt: „The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands“ 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Nomogrammi koostamiseks tuleks vetikad eraldada söötmest tsentrifuugimisega, millele järgneb resuspendeerimine destilleeritud vees. Asendusparameeter ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus tuleb mõõta igas proovis kolm korda. Analüüsida tuleb destilleeritud vett sisaldavaid tühiproove ning orgaanilise süsiniku kogusisaldus määratakse saadud sisalduse lahutamisel vetikaproovi orgaanilise süsiniku kogusisaldusest.

Nomogramm peab nõutava süsinikusisalduse vahemikus olema lineaarne. Näited on esitatud allpool.

N.B. Siin esitatud nomogramme ei tohi kasutada teisendamiseks; on oluline, et iga labor koostaks oma nomogrammid ise.



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

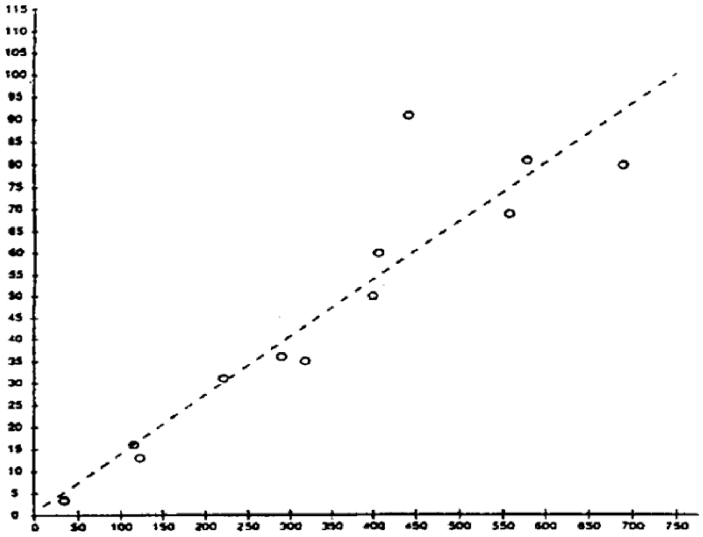
Seos kuivmassi (mg/l) ja orgaanilise süsiniku sisalduse (mg C/l) vahel. Andmed on saadud poolpideva partiiviisilise rakukultuuri kontsentreeritud suspensiooni kohta, pärast resuspendeerimist destilleeritud vees.

x-telg: kontsentreeritud vetikasööda orgaanilise süsiniku sisaldus, mg C/l.

y-telg: kontsentreeritud vetikasööda kuivmass, mg/l.

Parandustegur – 0,980

▼**M7**



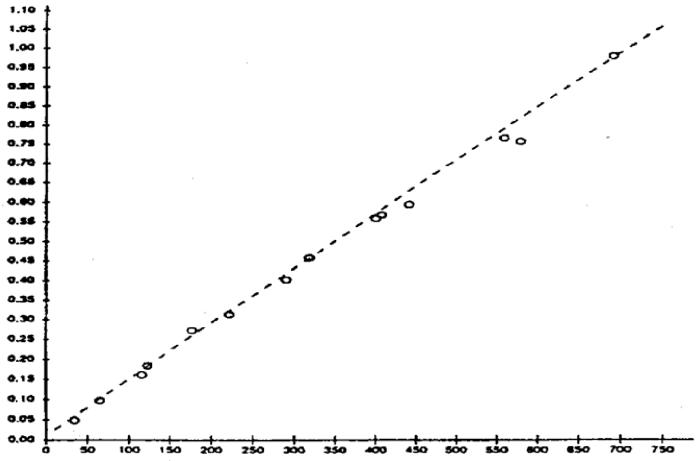
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Seos rakkude arvu ja orgaanilise süsiniku sisalduse (mg C/l) vahel. Andmed on saadud poolpideva partiiviisilise rakukultuuri kontsentreeritud suspensiooni kohta, pärast resuspendeerimist destilleeritud vees.

x-telg: kontsentreeritud vetikasööda orgaanilise süsiniku sisaldus, mg C/l.

y-telg: kontsentreeritud vetikasööda rakkude arv/l

Parandustegur – 0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Neelduvuse ja mg C/l vaheline seos (optilise tee pikkus 1 cm). Andmed on saadud poolpideva partiiviisilise rakukultuuri kontsentreeritud suspensiooni kohta, pärast resuspendeerimist destilleeritud vees.

x-telg: kontsentreeritud vetikasööda orgaanilise süsiniku sisaldus, mg C/l.

y-telg: Määratakse kontsentreeritud vetikasööda optiline neeldumine lainepikkusel 440 nm ja lahjendusel 1/10.

Parandustegur – 0,998

▼M7

4. liide

NÄIDISANDMELEHT KESKKONNA UUENDAMISE, FÜÜSIKALISE/KEEMILISE SEIRE ANDMETE, SÖÖTMISE, KIIVRIKE SIGIVUSE JA TÄISKASVANUD ISENDITE SUREMUSE REGISTREERIMISEKS

Katse nr:	Alguskuupäev:						Kloon:			Sööde:				Sööda liik:				Uuritav kemikaal:					Nimikontsentratsioon:	
Päev	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Söötme uuendamine (märkida „linnukesega“)																								
pH (*)																							uus	
																							vana	
O_2 (mg/l) (*)																							uus	
																							vana	
Temp (°C) (*)																							uus	
																							vana	
Söötmine (märkida „linnukesega“)																								
Elus järglaste arv (**)																								Kokku
Katsenõu 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — ET — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Katse nr:	Alguskuupäev:						Kloon:			Sööde:				Sööda liik:				Uuritav kemikaal:					Nimikontsentratsioon:	
Päev	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Kokku	
Kumulatiivne vanemate suremus (***)																								

(*) Märkige, millist nõu katseks kasutati.
(**) Märkige asjaomases lahtris aborteerunud haudmed tähisega „AB“ (*aborted brood*).
(***) Märkige asjaomases lahtris vanemloomade suremus tähisega „M“ (*mortality*).

▼**M7**

5. liide

NÄIDISANDMELEHT KEEMILISE ANALÜÜSI TULEMUSTE REGISTREERIMISEKS

a) **Mõõdetud kontsentratsioonid**

Nimikontsentratsioon	1. nädala proov		2. nädala proov		3. nädala proov	
	Värske	Vana	Värske	Vana	Värske	Vana

b) **Mõõdetud kontsentratsioon protsendina nimiväärtusest**

Nimikontsentratsioon	1. nädala proov		2. nädala proov		3. nädala proov	
	Värske	Vana	Värske	Vana	Värske	Vana

▼M7

6. liide

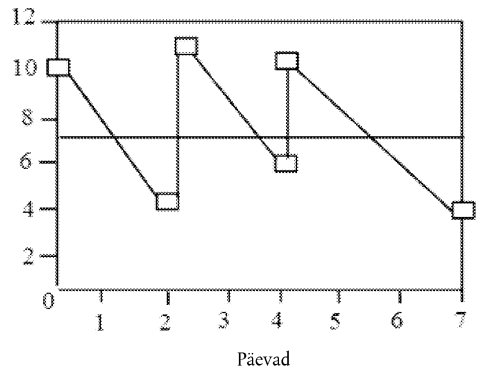
AJAGA KAALUTUD KESKMISE ARVUTAMINE

Ajaga kaalutud keskmine

Arvestades, et uuritava kemikaali kontsentratsioon võib söötme uuendamiste vahel väheneda, tuleb kaaluda, milline kontsentratsioon on kiivrike emasloomade söötme esinenud kontsentratsioonide suhtes esindav. Valiku tegemisel tuleks lähtuda nii bioloogilistest kui ka statistilistest teguritest. Näiteks kui arvatakse, et sigivust mõjutab kõige enam suurim kontsentratsioon, siis tuleks kasutada maksimaalset kontsentratsiooni. Kui aga arvatakse, et olulisem on toksilise kemikaali elusorganismi kogunemisest tulenev või pikaajaline mõju, siis on otstarbekam kasutada keskmist kontsentratsiooni. Sellisel juhul on sobiv keskmisena kasutada ajaga kaalutud keskmist kontsentratsiooni, kuna selle puhul võetakse arvesse hetkekontsentratsioonide varieerumist aja jooksul.

Joonis 1

Ajaga kaalutud keskmise näide



Joonisel 1 on näide (lihtsustatud) katse kohta, mis kestis seitse päeva ja mille puhul vahetati söödet 0., 2. ja 4. päeval.

— Peenike sakiline joon väljendab kontsentratsiooni igal ajahetkel. Oletatakse, et kontsentratsiooni vähenemine vastab eksponentsiaalsele lagunemisprotsessile.

— Kuus joonisele märgitud punkti kujutavad iga uuendamisperioodi alguses ja lõpus mõõdetud kontsentratsioone.

— Jäme pidevjoon näitab ajaga kaalutud keskmise asukohta.

Ajaga kaalutud keskmine arvutatakse selliselt, et ajaga kaalutud keskmise joonest allapoole jääva ala pindala on võrdne kontsentratsioonikõverast allapoole jääva ala pindalaga. Eespool toodud näidet käsitlevad arvutused on esitatud tabelis 1.

Tabel 1

Ajaga kaalutud keskmise („AK kesk“) arvutamine

Uuendamine nr	Days	Conc 0	Conc 1	Ln (Conc 0)	Ln (Conc 1)	Area
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼M7

Uuendamine nr	Days	Conc 0	Conc 1	Ln (Conc 0)	Ln (Conc 1)	Area
Päevad kokku:	7				Üldpindala:	50,092
					AK kesk:	7,156

Days tähistab uuendamisperioodi päevade arvu.

Conc 0 tähistab iga uuendamisperioodi alguses mõõdetud kontsentratsiooni.

Conc 1 tähistab iga uuendamisperioodi lõpus mõõdetud kontsentratsiooni.

Ln (Conc 0) tähistab *Conc 0* naturaallogaritmi.

Ln (Conc 1) tähistab *Conc 1* naturaallogaritmi.

Area on selle ala pindala, mis igal uuendamisperioodil asub allpool eksponentsiaalset kõverat. See arvutatakse järgmise valemi kohaselt:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Ajaga kaalutud keskmine (AK kesk) on üldpindala, mis on jagatud päevade üldarvuga.

Kiivriku sigivuse katse puhul tuleks tabelit loomulikult pikendada selliselt, et see hõlmaks 21 päeva.

On selge, et kui vaatlusi tehakse ainult iga uuendamisperioodi alguses ja lõpus, ei ole võimalik kinnitada, et lagunemisprotsess on tegelikult eksponentsiaalne. Teistsuguse kõvera puhul oleks pindala (*Area*) arvutamine teistsugune. Eksponentsiaalse lagunemisprotsessi olemasolu ei ole siiski ebatõenäoline ning seega on seda kirjeldava kõvera kasutamine muu teabe puudumise korral kõige otstarbekam.

Juhul, kui keemilise analüüsiga ei leita uuendamisperioodi lõpus jälgi uuritavast kemikaalist, tuleb siiski olla ettevaatlik. Kui kemikaali lahusest kadumise kiirust ei ole võimalik hinnata, on võimatu saada kõvera alla tõelevastavat pindala ja seega ei ole võimalik saada mõistlikku ajaga kaalutud keskmist.

▼M7

7. liide

JUHISED VASTKOORUNUD KIIVRIKU SOO MÄÄRAMISEKS

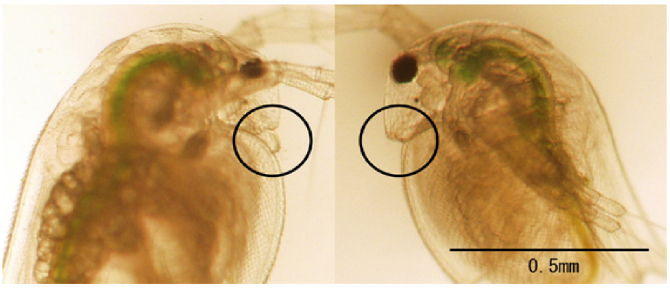
Muutuvates keskkonnatingimustes, nagu lühenev valge aeg, langev temperatuur, toidu kontsentratsiooni vähenemine ja suurenev asustustihedus võivad hakata kooruma isased noorloomad (Hobaek ja Larson, 1990; Kleiven jt, 1992). Isasloomade ilmumine on samuti üks teadaolevaid vastuseid teatavatele putukate kasvuregulaatoritele (Oda jt, 2005). Tingimustes, kus keemilised mõjurid vähendavad partenogeensete emasloomade sigivust, võiks eeldada isasloomade arvu suurenemist (OECD, 2008). Olemasoleva teabe põhjal ei ole võimalik prognoosida, milline sugude vahekorra või sigivuse näitaja on tundlikum; siiski on tõendeid (vt valideerimisaruanne, 1. osa), et see isasloomade arvu suurenemine järglaste hulgas võib olla vähem tundlik näitaja kui järglaste arvu vähenemine. Kuna katsemeetodi peamine eesmärk on hinnata saadud järglaste arvu, on isasloomade ilmumise jälgimine vabatahtlik. Kui uuringus vabatahtlikult hinnatakse seda näitajat, tuleb kasutada täiendavat katse nõuetekohasuse kriteeriumi; nimelt ei tohiks kontrolli katsetes ilmuda isasloomi üle 5 %.

Kõige praktilisem ja lihtsam viis kiivrike sooliseks eristamiseks on kasutada nende fenotüübilisi tunnuseid, kuna isas- ja emasloomad on geneetiliselt identsed ning nende soo määrab keskkond. Isas- ja emasloomad on erineva pikkusega ja nende esimeste tundlate välimus on erinev; isasloomadel on need pikemad kui emasloomadel (joonis 1). See erinevus on äratuntav kohe pärast koorumist, samas kui muud teisesed sugutunnused arenevad välja kiivrike täiskasvanuks saamisel (vt nt joonis 2, Olmstead ja LeBlanc, 2000).

Morfoloogilise soo hindamiseks tuleks iga vanema munadest koorunud vastsed võtta pipetti ja panna sellega Petri tassile, millel on katses kasutatav sööde. Söötme kogus peab olema minimaalne, et piirata loomade liikumist. Esimeste tundlate vaatlemiseks võib kasutada stereomikroskoopi (10–60).

Joonis 1

***D. magna* 24-tunnine isasloom (vasakul) ja emasloom (paremal). Isasloomi võib emasloomadest eristada esimeste tundlate pikkuse ja kuju järgi, nagu on osutatud ringidega (Tatarazako jt 2004).**



VIITED

Hobaek A. ja Larson P. 1990, „Sex determination in *Daphnia magna*“. *Ecology* 71: 2255–2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992, „Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli“. *Oikos* 65, 197–206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M. ja Iguchi T. 2005, „Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs“. *Chemosphere* 61: 1168–1174.

▼**M7**

OECD (2008), „Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test“. *OECD Series on Testing and Assessment*, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000, „Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*“. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2107–2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004, „Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea)“. *Environmental Science* 17, 439–449.

▼B

C.21. MULLAMIKROOBID: LÄMMASTIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 216 (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod kirjeldab laborimeetodit, mis on välja töötatud kemikaalide pikaajaliste mõjude uurimiseks mullamikroobide lämmastiku transformatsiooni suhtes pärast ühekordset kokkupuudet Katse põhineb peamiselt Euroopa ja Vahemeremaade taimekaitseorganisatsiooni soovitustel (1). Samuti võetakse arvesse muid juhised, sh Saksa Biologische Bundesanstalti (2), USA Keskkonnakaitseagentuuri (3), SETACi (4) ja Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni (5) juhiseid. Käesolevas katses kasutatavate mullaproovide arvu ja tüüpide osas lepiti kokku mulla ja sedimentide valikut käsitlevas OECD töörühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (6). Mullaproovide kogumist, käsitlemist ja säilitamist käsitlevad soovitused põhinevad ISO juhisdokumendil (7) ja Belgirate töörühma soovitustel. Katseainete toksiliste omaduste hindamisel võib osutuda vajalikuks määrata kindlaks mõjud mulla mikroobsele aktiivsusele, nt kui vajatakse andmeid põllukultuuride kaitsevahendite võimalike kõrvalmõjude kohta mulla mikrofloora suhtes või kui eeldatakse mullamikroobide kokkupuudet muude kemikaalidega kui põllukultuuride kaitsevahendid. Lämmastiku transformatsiooni katse tehakse selleks, et kindlaks määrata selliste kemikaalide mõju mulla mikrofloorale. Kui uuritakse agrokemikaale (nt põllukultuuride kaitsevahendid, väetised, metsanduskemikaalid), sooritatakse nii lämmastiku transformatsiooni kui ka süsiniku transformatsiooni katse. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, piisab lämmastiku transformatsiooni katsest. Kui selliste kemikaalide lämmastiku transformatsiooni katses saadud EC_{50}-väärtused on kaubanduslike nitrifikatsiooniinhibiitorite (nt nitrapüriin) esindavas vahemikus, saab täiendava teabe kogumiseks teha süsiniku transformatsiooni katse.

Muld koosneb elusatest ja elututes koostisosadest, mis eksisteerivad keerukates ja heterogeensetes segudes. Mikroobid mängivad tähtsat rolli viljaka mulla orgaanilise aine hajutamisel ja muutmisel, ning mõned liigid mõjutavad mulla viljakuse erinevaid aspekte. Kõik nimetatud biokeemiliste protsesside pikaajalised häired võivad häirida toitaineringlust ja see võib muuta mulla viljakust. Süsiniku ja lämmastiku transformatsioon toimub kõikides viljakates muldades. Kuigi nimetatud protsesse põhjustavad mikroobikogumid on mullati erinev, on transformatsioonirajad oma olemuselt samad.

Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et avastada aine pikaajalisi negatiivseid mõjusid aeroobsete pinnamuldade lämmastiku-transformatsiooni protsessile. Katsemeetod võimaldab samuti hinnata ainete mõjusid mulla mikrofloora süsiniku transformatsioonile. Nitraat tekib pärast süsinik-lämmastiksidemete lagunemist. Seetõttu kui nitraadi teke leitakse olevat samal tasemel katse- ja kontrollmuldades, on väga tõenäoline, et peamised süsinikusidemete lagunemisteed on puutumata ja toimivad hästi. Katses kasutatava substraadi (peenestatud lutsernijahu) süsiniku-lämmastiku suhe on soodne (tavaliselt 12/1 ja 16/1). Seetõttu ei vähendata süsiniku puudust katse käigus ja kui mikroobikogumeid kahjustab kemikaal, siis taastuvad need 100 päeva jooksul.

▼B

Käesoleva katsemeetodi aluseks olevad katsed töötati välja peamiselt ainete jaoks, mille pinnasesse jõudvat kogust saab ennustada. Sellised ained on näiteks põllukultuuride kaitsevahendid, mille annustamine põllule on teada. Agrokemikaalide puhul piisab sellest, kui uuritakse kahte annust oletatava annustamissageduse osas. Agrokemikaalide puhul saab uurida toimeaineid (a.i.) või preparaate. Katse ei piirdu siiski vaid agrokemikaalidega. Muutes nii pinnasesse annustavaid katseaine koguseid kui ka seda, kuidas andmeid hinnatakse, saab kasutada katset kemikaalide puhul, mille pinnasesse jõudev kogus ei ole teada. Seega määratakse kindlaks muude kemikaalide kui agrokemikaalid puhul kontsentratsiooni ridade mõjud lämmastiku transformatsioonile. Nimetatud katsetest saadud andmeid kasutatakse annuse-reaktsiooni kõvera koostamiseks ja EC_X väärtuste arvutamiseks, milles *x* on mõju protsendina.

1.2. MÕISTED

Lämmastiku transformatsioon – mikroobide tegevuse tulemusena ammonifikatsiooni- ja nitrifikatsiooniprotsessi kaudu toimuv, lämmastikku sisaldava orgaanilise aine lõplik lagunemine vastavaks anorgaaniliseks lõppsaaduseks, nitraadiks.

EC_X (efektiivkontsentratsioon) – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab lämmastiku transformatsiooni nitraadiks x protsenti.

EC_{50} (efektiivkontsentratsiooni mediaan) – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab lämmastiku transformatsiooni nitraadiks 50 protsenti (50 %).

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Sõelutud mulda parandatakse peenestatud taimejahuga ning seda kas töödeldakse seejärel katseainega või jäetakse töötlemata (kontrollproov). Kui uuritakse agrokemikaale, on soovitav kasutada vähemalt kahte katsekontsentratsiooni ja need tuleks valida suurima kontsentratsiooni suhtes, mis eeldatavasti esineb põllul. Pärast inkubeerimise 0-, 7., 14. ja 28. päeva ekstraheeritakse katse- ja kontrollmullaproove sobiva lahustiga ning määratakse kindlaks ekstraktides esinevad nitraadikogused. Nitraaditekke kiirust katseproovides võrreldakse kiirusega kontrollproovides ning arvutatakse katse- ja kontrollproovide protsentuaalne hälve. Kõik katsed kestavad vähemalt 28 päeva. Kui 28. päeval on katse- ja kontrollmullaproovide vahelised erinevused võrdsed või suuremad kui 25 %, jätkatakse mõõtmisi kuni 100 päeva. Kui ei uurita agrokemikaale, lisatakse mullaproovidele katseaine kontsentratsiooni ridu ning katse- ja kontrollproovides tekkinud nitraadikoguseid mõõdetakse pärast 28 inkubeerimispäeva. Mitmekordseid kontsentratsioone käsitlevate katsete tulemusi analüüsitakse regressioonmudelit kasutades, ning arvutatakse väärtused (s.t EC_{50}, EC_{25} ja/või EC_{10}). Vt mõisteid.

1.5. KATSE VALIIDSUS

Agrokemikaalidega tehtud katsete tulemuste hindamine põhineb suhtelistelt väikestel erinevustel (s.t keskmine väärtus on ± 25 %) kontroll- ja katsemullaproovide nitraadi kontsentratsioonide vahel, et kontrollproovide suured muutused võib viia väärate tulemusteni. Seetõttu peaksid paralleelsete kontrollproovide vahelised muutused olema väiksemad kui ± 15 %.

▼B

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Seadmed**

Katsetes kasutatakse mahuteid, mis on valmistatud keemiliselt inertsest materjalist. Mahutite mahutavus peaks vastama mullaproovide inkubeerimisprotseduurile, s.t üksikute mullaproovide massina või sarjana inkubeerimine (vt punkti 1.7.1.2). Tuleks tagada, et veekadu oleks katse käigus minimaalne ja gaasivahetus oleks võimalik (nt võib katsemahutid katta perforeeritud polüetüleenkilega). Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks kasutada mastabeeritavaid ja gaasikindlaid mahuteid. Need peaksid olema sellise suurusega, et ligikaudu üks neljandik nende mahust täidetakse mullaprooviga.

Katses kasutatakse järgmiseid standardseid laboriseadmeid:

— segamisseade: mehaaniline segur või vastav seade;

— tsentrifuug (3 000 g) või filtreerimisseade (kasutades nitraadivaba filterpaberit);

— nitraadi analüüsi jaoks piisava tundlikkuse mõõteseade, mille mõõtmistulemus on korduvteostatav.

1.6.2. **Mullaliikide valik ja arv**

Kasutatakse ühte mullaliiki. Soovitavad mullaomadused on järgmised:

— liivasisaldus: vähemalt 50 % ja kuni 75 %;

— pH: 5,5–7,5;

— orgaanilise süsiniku sisaldus: 0,5–1,5 %;

— mikroobi biomassi tuleks mõõta (8, 9) ja selle süsinikusisaldus peaks olema vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku koguhulgast.

Enamikul juhtudel nimetatud omadustega muld esindab halvimat juhtu, kuna uuritava kemikaali absorbtsioon on minimaalne ja selle kättesaadavus mikrofloorale on suurim. Sellest tulenevalt ei ole katsed muude mullaliikidega üldiselt vajalikud. Teatud juhtudel, nt kui katseainet eeldatavasti kasutatakse peamiselt muldades, nt happelised metsamullad, või kui kemikaalid on elektrostaatiliselt laetud, võib osutuda vajalikuks kasutada ka muud mullaliiki.

▼B

1.6.3. **Mullaproovide kogumine ja säilitamine**

1.6.3.1. *Kogumine*

Üksikasjalik teave proovikogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjade hulka kuuluvad täpne asukoht, taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemise kuupäevad, orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega töötlemine, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine. Mullaproovide kogumiseks valitud kohta peaks saama kasutada pikka aega. Sobivad on püsikarjamaad, üheaastaste teraviljakultuuridega (v.a mais) põllud või tihedalt külvatud haljaskesa. Valitud proovivõtukohta ei tohiks töödelda põllukultuuride kaitsevahenditega vähemalt ühe aasta jooksul enne proovide võtmist. Samuti ei tohiks kasutada orgaanilisi väetisi vähemalt kuus kuud. Mineraalväetiste kasutamine on lubatud üksnes siis, kui see vastab põllukultuuride nõuetele ja mullaproove ei tohiks võtta vähemalt kolm kuud pärast väetise kasutamist. Biotsiidi mõjuga (nt kaltsiumtsüaanamiid) väetistega töödeldud mulla kasutamist tuleks vältida.

Proovide võtmist tuleks vältida pikkade (rohkem kui 30 päeva) põuavõi vettimisperioodide ajal või vahetult pärast seda. Küntud muldade puhul tuleks proovid võtta 0–20 cm sügavuselt. Rohumaade (karjamaade) või muude muldade puhul, kui ei ole pikka aega küntud (vähemalt ühe kasvuperioodi vältel), peaks proovivõtu suurim sügavus olema veidi rohkem kui 20 cm (nt kuni 25 cm).

Mullaproovid tuleks transportida mahutites ja temperatuuridel, mis tagavad, et algseid mullaomadusi ei muudeta oluliselt.

1.6.3.2. *Säilitamine*

Värskelt põllult kogutud mulla kasutamine on eelistatud. Kui ei säilitamine laboris on vältimatu, võib mullaproovid lahustada pimedas temperatuuril 4 ± 2 °C maksimaalselt kolmeks kuuks. Mullaproovide säilitamise ajal tuleb tagada aeroobsed tingimused. Kui mullaproovid kogutakse piirkondadest, kus maapind on vähemalt kolm kuud aastas külmunud, saab kaaluda nende säilitamist kuueks kuuks miinus 18 °C kuni miinus 22 °C juures. Säilitatud mullaproovide mikroobi biomassi mõõdetakse enne igat katset ja biomassis peaks olema süsinikku vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku kogusisaldusest (vt punkti 1.6.2).

1.6.4 **Mullaproovide käsitlemine ja katseks ettevalmistamine**

1.6.4.1. *Eelinkubeerimine*

Kui mullaproovid säilitati (vt punkti 1.6.3.2), on soovitav eelinkubeerida 2–28 päeva. Mulla temperatuur ja niiskusesisaldus eelinkubeerimise ajal peaksid olema samasugused kui need, mida kasutati katses (vt punkte 1.6.4.2 ja 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Füüsikalis-keemilised omadused*

Muld puhastatakse käsitsi suurtest objektidest (nt kivid, taimeosad jne) ning seejärel märgsõelutakse ilma liigselt kuivatamata 2 mm või sellest väiksemateks osakeste suuruseks. Mullaproovi niiskusesisaldust peaks reguleerima destilleeritud või deioniseeritud veega 40–60 % maksimaalse veemahutavuseni.

1.6.4.3. *Parandamine orgaanilise substraadiga*

Mulda tuleks parandada sobiva orgaanilise substraadiga, nt peenestatud lutserni-rohujahu seguga (põhiline koostisosa on *Medicago sativa),* mille süsiniku-lämmastiku suhe on 12/1 ja 16/1. Soovitav lutserni-mulla suhe on 5 g lutserni ühe kilogrammi mulla kohta (kuivmass).

1.6.5. **Katseaine ettevalmistamine mulda annustamiseks**

Katseainet annustatakse tavaliselt kandeaine abil. Kandeaine võib olla vesi (veeslahustuvate ainete puhul) või inertne tahke aine, nt peen kvartsliiv (mille osakeste suurus on 0,1–0,5 mm). Vedelaid, veest erinevaid kandeaineid (nt orgaanilisi lahusteid, nagu atsetoon, kloroform) tuleks vältida, kuna nad võivad kahjustada mikrofloorat. Kui kasutatakse kandeainena liiva, saab selle katta katseainega, mis on sobivas lahustis lahustatud või suspendeeritud. Sellisel juhul tuleks lahusti eemaldada aurustumise teel enne mullaga segamist. Katseaine optimaalseks jaotumiseks mullas on soovitav suhe 10 g liiva ühe kilogrammi mulla kohta (kuivmass). Kontrollproove töödeldakse sarnase veehulgaga ja/või üksnes kvartsliivaga.

Kui uuritakse lenduvaid kemikaale, tuleks vältida kadusid töötlemise ajal niipalju kui võimalik ja tuleks püüda tagada homogeenne jaotus mullas (nt katseainet tuleks injekteerida mulda mitmes kohas).

1.6.6. **Uuritavad kontsentratsioonid**

Kui uuritakse agrokemikaale, tuleks kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni. Väiksem kontsentratsioon peaks kajastama vähemalt katseaine kasutamisel mulda jõudvat suurimat eeldatavat kogust ning suurem kontsentratsioon peaks olema väiksema kontsentratsiooni kordne. Mulda lisatavate katseainete kontsentratsioonid arvutatakse eeldusel, et aine imendub ühtlaselt 5 cm sügavusele ja mulla lasuvustihedus on 1,5. Agrokemikaalide puhul, mida annustatakse otse mulda, või kemikaalide puhul, mille mulda jõudvat kogust saab ennustada, on soovitavad katsekontsentratsioonid suurimad arvutuskontsentratsioonid (PEC) ja neist viis korda suuremad kontsentratsioonid. Uurides aineid, mida eeldatavasti annustatakse mulda mitmel korral ühel aastaajal, peaks katsekontsentratsioon olema saadud PEC korrutamisel suurima eeldatava annustamiste arvuga. Kõrgeim uuritav kontsentratsioon ei tohiks siiski olla suurem kui kümnekordne suurim üksikannus. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks kasutada vähemalt viie kontsentratsiooni geomeetrilist sarja. Uuritavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama EC_x väärtuste kindlaksmääramiseks vajalikku vahemikku.

▼B

1.7. KATSE KÄIK

1.7.1. **Kokkupuute tingimused**

1.7.1.1. *Katse- ja kontrollproovid*

Kui uuritakse agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kolmeks võrdse massiga osaks. Kaks osa segatakse kandeainega, mis sisaldab katseainet, ning kolmas osa segatakse kandeainega, mis ei sisalda katseainet (kontrollproov). On soovitav kasutada vähemalt kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide korral. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kuueks võrdse massiga osaks. Viis proovi segatakse katseainet sisaldava kandeainega ja kuues proov segatakse kandeainega, mis ei sisalda kemikaali. On soovitav kasutada kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide korral. Tuleks tagada katseaine ühtlane jaotus katseproovide hulka kuuluvates mullaproovides. Segamise ajal tuleks vältida mulla pallideks vormimist.

1.7.1.2. *Mullaproovide inkubeerimine*

Mullaproove inkubeeritakse kahel moel: katse- ja kontrollmullaproovide koondproovina või katse ja kontrollmullaproovide üksikute ja võrdse suurusega osaproovide sarjana. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana. Kui mullaproovid inkubeeritakse koondproovina, valmistatakse ette katse- ja kontrollmullaproovide suured kogused ning vastavalt vajadusele analüüsitavad osaproovid katse käigus. Algselt iga katse- või kontrollproovi kohta ettevalmistatud kogus sõltub osaproovide suurusest, kasutatud paralleelsete proovide arvust ja suurimatest eeldatavatest proovide võtmise aegadest. Koondproovina inkubeeritavad mullaproovid tuleks enne osaproovide võtmist hoolega segada. Kui mullaproovid inkubeeritakse üksikute mullaproovide sarjana, jagatakse iga katse- ja kontrollmullaproovide koondproov soovitud arvuks osaproovideks, ning neid kasutatakse vastavalt vajadusele. Katsetest, kus eeldatakse rohkem kui kahte proovide võtmise aega, tuleks ette valmistada piisavalt osaproove kõikide paralleelproovide ja proovivõtuaegade jaoks. Vähemalt kolme uuritava mullaproovi paralleelproovi tuleks inkubeerida aeroobsetes tingimustes (vt punkti 1.7.1.1). Kõikide katsete käigus tuleks kasutada sobivaid mahuteid, milles on piisavalt õhuruumi, et vältida anaeroobsete tingimuste tekkimist. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana.

1.7.1.3. *Katsetingimused ja katse kestus*

Katset tehakse pimedas toatemperatuuril 20 ± 2 °C. Mullaproovide niiskusesisaldust tuleks säilitada katse käigus 40–60 % mulla suurimast veemahutavusest (vt punkti 1.6.4.2) vahemikus ± 5 %. Vajaduse korral võib lisada destilleeritud, deioniseeritud vett.

Katsete minimaalne kestus on 28 päeva. Kui uuritakse agrokemikaale, võrreldakse katse- ja kontrollproovides nitraaditekke kiirust. Kui need erinevad 28. päeval rohkem kui 25 %, jätkatakse katset seni, kuni erinevus võrdub või on väiksem kui 25 %, või maksimaalselt 100 päeva, olenevalt sellest, kummaks kulub vähem aega. Muude kui agrokemikaalide puhul lõpetatakse katse pärast 28 päeva. Arvutatakse EC_x väärtused.

▼B

1.7.2. **Mullaproovide võtmine ja analüüs**

1.7.2.1. *Mullaproovide võtmise ajakava*

Kui uuritakse agrokemikaale, analüüsitakse mullaproovides nitraati 0-, 7., 14. ja 28. päeval. Kui on vaja katset pikendada, tuleks teha täiendavad mõõtmised 14päevaste intervallide tagant pärast 28. päeva.

Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, kasutatakse vähemalt viit katsekontsentratsiooni ja analüüsitakse mullaproovides nitraati kokkupuute perioodi alguses (0-päev) ja lõpus (28. päev). Võib lisada vajaduse korral vahepealse mõõtmise, nt 7. päeval. 28. päeval saadud teavet kasutatakse kemikaali EC_x väärtuse kindlaksmääramiseks. Soovi korral võib kasutada 0-päeval kontrollproovidest saadud andmeid mullas nitraadi algkogusest teatamiseks.

1.7.2.2. *Mullaproovide analüüs*

Igas katse- ja kontrollproovi paralleelproovis tekkinud nitraadi kogus määratakse kindlaks igal proovivõtuajal. Nitraat ekstraheeritakse mullast proovide raputamise teel sobiva ekstrahendiga, nt kaaliumkloriidilahus (0,1 M). Soovitav suhe on 5 ml KCl lahust mullaproovi ühe kuivmassi grammi kohta. Ekstraheerimise optimeerimiseks ei tohiks mulla ja ekstrahendi mahutid olla rohkem kui pooltäis. Segu raputatakse 150 rpm 60 minutit. Segusid tsentrifuugitakse või filtreeritakse ning analüüsitakse vedelfaasist nitraat. Osakestevabad vedelikuekstraktid võib säilitada enne analüüsi miinus 20 ± 5 °C juures kuni kuus kuud.

2. **TULEMUSED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Kui katseid tehakse agrokemikaalidega, tuleks registreerida igas mullaproovi paralleelproovis tekkinud nitraadikogus ja tuleks esitada kõikide paralleelproovide keskmised väärtused tabeli kujul. Lämmastiku transformatsiooni kiirusi tuleks hinnata sobivate ja üldiselt heakskiidetud statistiliste meetodite abil (nt F-katse, 5 % olulisusaste). Tekkinud nitraadi koguseid väljendatakse mg nitraadina mulla kuivmassi kg kohta päevas. Nitraadi tekke kiirusi igas katseproovis võrreldakse kiirustega kontrollproovis ning arvutatakse kontrollproovide protsentuaalne hälve.

Kui katseid tehakse muude kui agrokemikaalidega, määratakse kindlaks igas paralleelproovis tekkinud nitraadi kogused ning koostatakse annuse-reaktsiooni kõver EC_x väärtuste hindamiseks. Nitraadikoguseid (s.t mg nitraati mulla kuivmassi kg kohta) katseproovides pärast 28 päeva võrreldakse kontrollproovis olevate nitraadikogustega. Nimetatud andmete põhjal arvutatakse protsentuaalsed inhibitsiooniväärtused iga katsekontsentratsiooni kohta. Need protsendimäärad registreeritakse kontsentratsioonina ning seejärel kasutatakse statistilisi protseduure EC_x väärtuste arvutamiseks. Usalduspiirid ($p = 0,95$) arvutatud EC_x puhul määratakse samuti kindlaks standardprotseduuride abil (10, 11, 12).

Katseained, mis sisaldavad lämmastiku suuri koguseid võivad mõjutada katse käigus tekkivaid nitraadikoguseid. Kui nimetatud aineid uuritakse suurte kontsentratsioonidena (nt kemikaalid, mida eeldatavasti annustatakse korduvalt), peaks katse sisaldama sobivaid kontrolle (s.t mullaproov ja katseaine ilma taimejahuta). Nimetatud kontrollidest saadud andmeid peab võtma arvesse EC_x väärtuste arvutamisel.

▼B

2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kui hinnatakse agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi ning nitraaditekke kiiruste erinevus madalamate katseaineannuste (mis vastab suurimale eeldatavale kontsentratsioonile) ja kontrollproovide vahel on võrdne või väiksem kui 25 % mis tahes proovivõtuajal pärast 28 päeva möödumist, saab hinnata, et katseainel ei ole pikaajalist toimet lämmastiku tekkele muldades. Kui muude kemikaalide kui agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi hinnatakse, kasutatakse EC_{50}, EC_{25} ja/või EC_{10} väärtusi.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Kasutatava mulla täielik identifitseerimine, kaasa arvatud:

— geograafiline viide kohale (laiuskraad, pikkuskraad);

— teave koha ajaloo kohta (s.t taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemine, väetistega töötlemine, juhuslik saastamine jne);

— kasutusviis (nt põllumaa, mets jne):

— proovivõtu sügavus (cm);

— liiva-/aleuriidi-/savisisaldus (protsenti kuivmassist);

— pH (vees);

— orgaanilise süsiniku sisaldus (protsenti kuivmassist);

— lämmastikusisaldus (protsenti kuivmassist);

— algne lämmastikusisaldus (mg nitraati kg kuivmassi kohta);

— katioonvahetusvõime (mmol/kg);

— mikroobi biomass protsendina orgaanilise süsiniku koguhulgast;

— viide iga parameetri määramismeetodi kohta;

— kogu teave mullaproovide kogumise ja säilitamise kohta;

— vajaduse korral üksikandmed mulla eelinkubeerimise kohta.

Katseaine:

— füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— vajaduse korral keemilised tunnusandmed, sh struktuurivalem, puhtus (s.t põllukultuuride kaitsevahendite toimeaine protsendimäär), lämmastikusisaldus.

Substraat:

— substraadi allikas;

— koostis (lutsernijahu, lutserni-rohujahu);

— süsiniku-, lämmastikusisaldus (protsenti kuivmassist);

— sõelaava suurus (mm).

▼B

Katsetingimused:

— üksikasjalikud andmed mulla parandamise kohta orgaanilise substraadiga;

— uuritava kemikaali kontsentratsioonide arv ja vajaduse korral valitud kontsentratsioonide põhjendus;

— üksikasjalikud andmed katseaine mulda annustamise kohta;

— inkubatsioonitemperatuur;

— mulla niiskusesisaldus katse alguses ja kestel;

— kasutatav mulla inkubeerimismeetod (koondproovina või üksikute osaproovide sarjana);

— paralleelsete proovide arv;

— proovivõtuajad;

— nitraadi mullast ekstraheerimise meetod.

Tulemused:

— analüüsimeetod ja -seade, mida kasutatakse nitraadi analüüsimiseks;

— andmed tabeli kujul, sh nitraadi mõõtmiste üksikud ja keskväärtused;

— katse- ja kontrollproovide paralleelproovide vaheline muutus;

— arvutustega tehtud paranduste selgitused, kui on vaja;

— nitraadi tekke kiiruse protsentuaalne muutus igal proovivõtukorral või vajaduse korral EC_{50} väärtus 95 % usaldusvahemikus, muud EC_x väärtused (s.t EC_{25} või EC_{10}) usaldusvahemikes ning annuse-reaktsiooni kõver;

— tulemuste statistiline töötlemine;

— kogu teave ja vaatlused, mis aitaksid tõlgendada tulemusi.

4. **VIITED**

1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Sou Quality – Biological Methods.

▼B

6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18-20 January 1995.

7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling andstorageof soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, 99–113.

11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. **MULLAMIKROOBID: SÜSINIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE**

1. **MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 217 (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod kirjeldab laborimeetodit, mis on välja töötatud selleks, et uurida põllukultuuride kaitsevahendite ja muude võimalike kemikaalide pikaajalisi mõjusid mullamikroobide süsiniku transformatsioonile ühekordse kokkupuute järel. Katse põhineb peamiselt Euroopa ja Vahemere taimekaitseorganisatsiooni soovitustel (1). Samuti võetakse arvesse muid juhised, sh Saksa Biologische Bundesanstalti (2), USA Keskkonnakaitseagentuuri (3) ja SETACi (4) juhiseid. Käesolevas katses kasutatavate mullaproovide arvu ja tüüpide osas lepiti kokku mulla ja sedimentide valikut käsitlevas OECD töörühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (5). Mullaproovide kogumist, käsitlemist ja säilitamist käsitlevad soovitused põhinevad ISO juhisdokumendil (6) ja Belgirate töörühma soovitustel.

Katseainete toksiliste omaduste hindamisel võib osutuda vajalikuks määrata kindlaks mõjud mulla mikroobsele aktiivsusele, nt kui vajatakse andmeid põllukultuuride kaitsevahendite võimalike kõrvalmõjude kohta mulla mikrofloora suhtes või kui eeldatakse mullamikroobide kokkupuudet muude kemikaalidega kui põllukultuuride kaitsevahendid. Süsiniku transformatsiooni katse tehakse selleks, et kindlaks määrata selliste kemikaalide mõju mulla mikrofloorale. Kui uuritakse agrokemikaale (nt põllukultuuride kaitsevahendid, väetised, metsanduskemikaalid), sooritatakse nii süsiniku transformatsiooni kui ka lämmastiku transformatsiooni katse. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, piisab lämmastiku transformatsiooni katsest. Kui selliste kemikaalide lämmastiku transformatsiooni katses saadud EC_{50} väärtused on kaubanduslike nitrifikatsiooniinhibiitorite (nt nitrapüriin) esindavas vahemikus, saab täiendava teabe kogumiseks teha süsiniku transformatsiooni katse.

Muld koosneb elusatest ja elututest koostisosadest, mis eksisteerivad keerukates ja heterogeensetes segudes. Mikroobid mängivad tähtsat rolli viljaka mulla orgaanilise aine hajutamisel ja muutmisel, ning mõned liigid mõjutavad mulla viljakuse erinevaid aspekte. Kõik nimetatud biokeemiliste protsesside pikaajalised häired võivad häirida toitaineringlust ja see võib muuta mulla viljakust. Süsiniku ja lämmastiku transformatsioon toimub kõikides viljakates muldades. Kuigi nimetatud protsesse põhjustav mikroobikogum on mullati erinev, on transformatsioonirajad oma olemuselt samad.

▼B

Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et avastada aine pikaajalisi negatiivseid mõjusid aeroobsete pinnamuldade süsiniku transformatsiooni protsessile. Katse on tundlik süsiniku transformatsioonis osaleva mikroobikogumi suuruse ja tegevuse muutuste suhtes, kuna katses lastakse neil mikroobikogumitel osa saada nii keemilisest stressist kui ka süsinikupuudusest. Kasutatakse liivast mulda, mille orgaanilise aine sisaldus on madal. Seda mulda töödeldakse katseainega ja inkubeeritakse tingimustes, mis võimaldavad kiiret mikroobide ainevahetust. Nimetatud tingimustes on kiirelt vähenenud kergesti kättesaadava süsiniku allikad mullas. See põhjustab süsiniku puudust, mis tapab mikroobirakud ning kutsub esile puhkeperioodi ja/või sporulatsiooni. Kui katset tehakse kauem kui 28 päeva, saab mõõta nimetatud reaktsiooni summat (töötlemata mulla) kontrollproovides metaboolselt aktiivse mikroobi biomassi järkjärgulise vähenemisena (7). Kui süsinikupuuduses vaevlevas mullas olevat biomassi mõjutab katsetingimustes kemikaali esinemine, ei saa see pöörduda tagasi samale tasemele nagu kontrollproovis olev biomass. Seetõttu katseaine põhjustatud häireid mis tahes ajal katse käigus kestavad tihti kuni katse lõpuni.

Käesoleva katsemeetodi aluseks olevad katsed töötati välja peamiselt ainete jaoks, mille pinnasesse jõudvat kogust saab ennustada. Sellised ained on näiteks põllukultuuride kaitsevahendid, mille annustamine põllule on teada. Agrokemikaalide puhul piisab sellest, kui uuritakse kahte annust oletatava annustamissageduse osas. Agrokemikaalide puhul saab uurida toimeaineid (a.i.) või preparaate. Katse ei piirdu siiski vaid prognoositavaid arvestuskontsentratsioone omavate kemikaalidega. Muutes nii pinnasesse annustatavaid katseaine koguseid kui ka seda, kuidas andmeid hinnatakse, saab kasutada katset kemikaalide puhul, mille pinnasesse jõudev kogus ei ole teada. Seega määratakse kindlaks muude kemikaalide kui agrokemikaalid puhul kontsentratsiooni ridade mõjud süsiniku transformatsioonile. Nimetatud katsetest saadud andmeid kasutatakse annuse-reaktsiooni kõvera koostamiseks ja EC_X väärtuste arvutamiseks, milles x on mõju protsendina.

1.2. MÕISTED

Süsiniku transformatsioon – orgaanilise aine lagundamine mikroorganismide poolt anorgaaniliseks lõppsaaduseks, süsinikdioksiidiks.

EC_X (efektiivkontsentratsioon) – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab süsiniku transformatsiooni süsinikdioksiidiks x protsendiga.

EC_{50} (efektiivkontsentratsiooni mediaan) – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab süsiniku transformatsiooni süsinikdioksiidiks 50 protsendiga.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

▼B

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Sõelutud mulda töödeldakse kas katseainega või jäetakse töötlemata (kontroll). Kui uuritakse agrokemikaale, on soovitav kasutada vähemalt kahte katsekontsentratsiooni ja need tuleks valida suurima kontsentratsiooni suhtes, mis eeldatavasti esineb põllul. Pärast 0-, 7., 14. ja 28. inkubeerimispäeva segatakse katse- ja kontrollmullaproovid glükoosiga ning glükoosi põhjustatud hingamiskiirust mõõdetakse järjestikusel 12 tunnil. Hingamiskiirusi väljendatakse vabanenud süsinikdioksiidina (mg süsinikdioksiidi mulla kuivmassi kg kohta tunnis) või tarbitud hapnikuna (mg hapnikku kg mulla kohta tunnis). Keskmist hingamiskiirust katseproovides võrreldakse sama hingamiskiirusega kontrollproovides ning arvutatakse katseproovi ja kontrollproovi vaheline protsentuaalne hälve. Kõik katsed kestavad vähemalt 28 päeva. Kui 28. päeval on katse- ja kontrollproovide vahelised erinevused võrdsed või suuremad kui 25 %, jätkatakse mõõtmisi 14päevaste intervallidega kuni maksimaalselt 100 päeva. Kui uuritakse muid kemikaale kui agrokemikaalid, lisatakse mullaproovidele katseaine kontsentratsioonide sari ning mõõdetakse glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi (s.t tekkinud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku koguste keskmine) pärast 28 päeva möödumist. Kontsentratsioonide sarja käsitlevate katsete tulemusi analüüsitakse regressioonmudelit kasutades, ning arvutatakse EC_X väärtused (s.t EC_{50}, EC_{25} ja/või EC_{10}). Vt mõisteid.

1.5. KATSE VALIIDSUS

Agrokemikaalidega tehtud katsete tulemuste hindamine põhineb suhtelistelt väikestel erinevustel (s.t keskmine väärtus on ± 25 %) kontroll- ja katsemullaproovides vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku vahel, et kontrollproovide suured muutused võivad viia väärate tulemusteni. Seetõttu peaksid paralleelsete kontrollproovide vahelised muutused olema väiksemad kui ± 15 %.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Seadmed**

Katsetes kasutatakse mahuteid, mis on valmistatud keemiliselt inertsest materjalist. Mahutite mahutavus peaks vastama mullaproovide inkubeerimisprotseduurile, s.t üksikute mullaproovide massina või sarjana inkubeerimine (vt punkti 1.7.1.2). Tuleks tagada, et veekadu oleks katse käigus minimaalne ja gaasivahetus oleks võimalik (nt võib katsemahutid katta perforeeritud polüetüleenkilega). Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks kasutada mastabeeritavaid ja gaasikindlaid mahuteid. Need peaksid olema sellise suurusega, et ligikaudu üks neljandik nende mahust täidetakse mullaprooviga.

Glükoosi põhjustatud hingamise kindlaksmääramisel on nõutavad inkubeerimissüsteemid ja süsinikdioksiidi tootmise või hapniku tarbimise mõõtmisseadmed. Selliste süsteemide ja seadmete kohta käivad näiteid võib leida kirjandusviidetest (8, 9, 10, 11).

1.6.2. **Mullaliikide valik ja arv**

Kasutatakse ühte mullaliiki. Soovitavad mullaomadused on järgmised:

— liivasisaldus: vähemalt 50 % ja kuni 75 %,

▼B

— pH: 5,5–7,5;

— orgaanilise süsiniku sisaldus: 0,5–1,5 %;

— mikroobi biomassi tuleks mõõta (12, 13) ja selle süsinikusisaldus peaks olema vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku koguhulgast.

Enamikul juhtudel nimetatud omadustega muld esindab halvimat juhtu, kuna uuritava kemikaali absorbtsioon on minimaalne ja selle kättesaadavus mikrofloorale on suurim. Sellest tulenevalt ei ole katsed muude mullaliikidega üldiselt vajalikud. Teatud juhtudel, nt kui katseainet eeldatavasti kasutatakse peamiselt muldades, nt happelised metsamullad, või kui kemikaalid on elektrostaatiliselt laetud, võib osutuda vajalikuks kasutada ka muud mullaliiki.

1.6.3. **Mullaproovide kogumine ja säilitamine**

1.6.3.1. *Kogumine*

Üksikasjalik teave proovikogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjade hulka kuuluvad täpne asukoht, taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemise kuupäevad, orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega töötlemine, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine. Mullaproovide kogumiseks valitud kohta peaks saama kasutada pikka aega. Sobivad on püsikarjamaad, üheaastaste teraviljakultuuridega (v.a mais) põllud või tihedalt külvatud haljaskesa. Valitud proovivõtukohta ei tohiks töödelda põllukultuuride kaitsevahenditega vähemalt ühe aasta jooksul enne proovide võtmist. Samuti ei tohiks kasutada orgaanilisi väetisi vähemalt kuus kuud. Mineraalväetiste kasutamine on lubatud üksnes siis, kui see vastab põllukultuuride nõuetele ja mullaproove ei tohiks võtta vähemalt kolm kuud pärast väetise kasutamist. Biotsiidi mõjuga (nt kaltsiumtsüaanamiid) väetistega töödeldud mulla kasutamist tuleks vältida.

Proovide võtmist tuleks vältida pikkade (rohkem kui 30 päeva) põua- või vettimisperioodide ajal või vahetult pärast seda. Küntud muldade puhul tuleks proovid võtta 0–20 cm sügavuselt. Rohumaade (karjamaade) või muude muldade puhul, kui ei ole pikka aega küntud (vähemalt ühe kasvuperioodi vältel), peaks proovivõtu suurim sügavus olema veidi rohkem kui 20 cm (nt kuni 25 cm). Mullaproovid tuleks transportida mahutites ja temperatuuridel, mis tagavad, et algseid mullaomadusi ei muudeta oluliselt.

1.6.3.2. *Säilitamine*

Värskelt põllult kogutud mulla kasutamine on eelistatud. Kui ei säilitamine laboris on vältimatu, võib mullaproove säilitada pimedas temperatuuril 4 ± 2 °C maksimaalselt kolm kuud. Mullaproovide säilitamise ajal tuleb tagada aeroobsed tingimused. Kui mullaproovid kogutakse piirkondadest, kus maapind on vähemalt kolm kuud aastas külmunud, saab kaaluda nende säilitamist kuueks kuuks miinus 18 °C juures. Säilitatud mullaproovide mikroobi biomassi mõõdetakse enne igat katset ja biomassis peaks olema süsinikku vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku kogusisaldusest (vt punkti 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Mullaproovide käsitlemine ja katseks ettevalmistamine**

1.6.4.1. *Eelinkubeerimine*

Kui mullaproove säilitati (vt punkte 1.6.4.2 ja 1.7.1.3), on soovitav eelinkubeerida 2–28 päeva. Mulla temperatuur ja niiskusesisaldus eelinkubeerimise ajal peaksid olema samasugused kui need, mida kasutati katses (vt punktid 1.6.4.2 ja 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Füüsikalis-keemilised omadused*

Muld puhastatakse käsitsi suurtest objektidest (nt kivid, taimeosad jne) ning seejärel märgsõelutakse ilma liigselt kuivatamata 2 mm või sellest väiksemateks osakeste suuruseks. Mullaproovi niiskusesisaldust peaks reguleerima destilleeritud või deioniseeritud veega 40–60 % maksimaalse veemahutavuseni.

1.6.5. **Katseaine ettevalmistamine mulda annustamiseks**

Katseainet annustatakse tavaliselt kandeaine abil. Kandeaine võib olla vesi (veeslahustuvate ainete puhul) või inertne tahke aine, nt peen kvartsliiv (mille osakeste suurus on 0,1–0,5 mm). Vedelaid, veest erinevaid kandeaineid (nt orgaanilisi lahusteid nagu atsetoon, kloroform) tuleks vältida, kuna nad võivad kahjustada mikrofloorat. Kui kasutatakse kandeainena liiva, saab selle katta katseainega, mis on sobivas lahustis lahustatud või suspendeeritud. Sellisel juhul tuleks lahusti eemaldada aurustumise teel enne mullaga segamist. Katseaine optimaalseks jaotumiseks mullas on soovitav suhe 10 g liiva ühe kilogrammi mulla kohta (kuivmass). Kontrollproove töödeldakse sarnase veehulgaga ja/või üksnes kvartsliivaga.

Kui uuritakse lenduvaid kemikaale, tuleks vältida kadusid töötlemise ajal niipalju kui võimalik ja tuleks püüda tagada ühtlane jaotus mullas (nt katseainet tuleks injekteerida mulda mitmes kohas).

1.6.6. **Uuritavad kontsentratsioonid**

Kui uuritakse põllukultuuride kaitsevahendeid või muid prognoositavaid arvestuskontsentratsioone omavaid kemikaale, tuleks kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni. Väiksem kontsentratsioon peaks kajastama vähemalt katseaine kasutamisel mulda jõudvat suurimat eeldatavat kogust ning suurem kontsentratsioon peaks olema väiksema kontsentratsiooni kordne. Mulda lisatavate katseainete kontsentratsioonid arvutatakse eeldusel, et aine imendub ühtlaselt 5 cm sügavusele ja mulla lasuvustihedus on 1,5. Agrokemikaalide puhul, mida annustatakse otse mulda, või kemikaalide puhul, mille mulda jõudvat kogust saab ennustada, on soovitavad katsekontsentratsioonid suurimad arvutuskontsentratsioonid (PEC) ja neist viis korda suuremad kontsentratsioonid. Uurides aineid, mida eeldatavasti annustatakse mulda mitmel korral ühel aastaajal, peaks katsekontsentratsioon olema saadud PEC korrutamisel suurima eeldatava annustamiste arvuga. Kõrgeim uuritav kontsentratsioon ei tohiks siiski olla suurem kui kümnekordne suurim üksikannus.

Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks kasutada vähemalt viie kontsentratsiooni geomeetrilist sarja. Uuritavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama EC_X väärtuste kindlaksmääramiseks vajalikku vahemikku.

▼B

1.7. KATSE KÄIK

1.7.1. **Kokkupuute tingimused**

1.7.1.1. *Katse- ja kontrollproovid*

Kui uuritakse agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kolmeks võrdse massiga osaks. Kaks osa segatakse kandeainega, mis sisaldab katseainet, ning kolmas osa segatakse kandeainega, mis ei sisalda katseainet (kontrollproov). On soovitav kasutada vähemalt kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide puhul. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kuueks võrdse massiga osaks. Viis proovi segatakse katseainet sisaldava kandeainega ja kuues proov segatakse kandeainega, mis ei sisalda kemikaali. On soovitav kasutada kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide korral. Tuleks tagada katseaine ühtlane jaotus katseproovide hulka kuuluvates mullaproovides. Segamise ajal tuleks vältida mulla pallideks vormimist.

1.7.1.2. *Mullaproovide inkubeerimine*

Mullaproove inkubeeritakse kahel moel: katse- ja kontrollmullaproovide koondproovina või katse ja kontrollmullaproovide üksikute ja võrdse suurusega osaproovide sarjana. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana. Kui mullaproovid inkubeeritakse koondproovina, valmistatakse ette katse- ja kontrollmullaproovide suured kogused ning vastavalt vajadusele analüüsitavad osaproovid katse käigus. Algselt iga katse- või kontrollproovi kohta ettevalmistatud kogus sõltub osaproovide suurusest, kasutatud paralleelsete proovide arvust ja suurimatest eeldatavatest proovide võtmise aegadest. Koondproovina inkubeeritavad mullaproovid tuleks enne osaproovide võtmist hoolega segada. Kui mullaproovid inkubeeritakse üksikute mullaproovide sarjana, jagatakse iga katse- ja kontrollmullaproovide koondproov soovitud arvuks osaproovideks, ning neid kasutatakse vastavalt vajadusele. Katsetest, kus eeldatakse rohkem kui kahte proovide võtmise aega, tuleks ette valmistada piisavalt osaproove kõikide paralleelproovide ja proovivõtuaegade jaoks. Vähemalt kolme uuritava mullaproovi paralleelproovi tuleks inkubeerida aeroobsetes tingimustes (vt punkti 1.7.1.1). Kõikide katsete käigus tuleks kasutada sobivaid mahuteid, milles on piisavalt õhuruumi, et vältida anaeroobsete tingimuste tekkimist. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana.

1.7.1.3. *Katsetingimused ja katse kestus*

Katset tehakse pimedas toatemperatuuril 20 ± 2 °C. Mullaproovide niiskusesisaldust tuleks säilitada katse käigus 40–60 % mulla suurimast veemahutavusest (vt punkti 1.6.4.2) vahemikus ± 5 %. Vajaduse korral võib lisada destilleeritud, deioniseeritud vett.

Katsete minimaalne kestus on 28 päeva. Kui uuritakse agrokemikaale, võrreldakse katse- ja kontrollproovides vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku koguseid. Kui need erinevad 28. päeval rohkem kui 25 %, jätkatakse katset seni, kuni erinevus võrdub või on väiksem kui 25 %, või maksimaalselt 100 päeva, olenevalt sellest, kummaks kulub vähem aega. Muude kui agrokemikaalide puhul lõpetatakse katse pärast 28 päeva. 28. päeval määratakse kindlaks katse- ja kontrollmullaproovides vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku kogused ja arvutatakse EC_x väärtused.

▼B

1.7.2. **Mullaproovide võtmine ja analüüs**

1.7.2.1. *Mullaproovide võtmise ajakava*

Kui uuritakse agrokemikaale, analüüsitakse mullaproovides glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi 0., 7., 14. ja 28. päeval. Kui on vaja katset pikendada, tuleks teha täiendavad mõõtmised 14päevaste intervallide tagant pärast 28. päeva.

Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, kasutatakse vähemalt viit katsekontsentratsiooni ja analüüsitakse mullaproovides glükoosi põhjustatud hingamist kokkupuute perioodi alguses (0-päev) ja lõpus (28. päev). Võib lisada vajaduse korral vahepealse mõõtmise, nt 7. päeval. 28. päeval saadud teavet kasutatakse kemikaali EC_x väärtuse kindlaksmääramiseks. Soovi korral võib kasutada 0-päeval kontrollproovidest saadud andmeid mullas metaboolselt aktiivse mikroobi biomassi algkogustest teatamiseks (12).

1.7.2.2. *Glükoosi põhjustatud hingamiskiiruste mõõtmine*

Iga katseproovi ja kontrollproovi paralleelse proovi glükoosi põhjustatud hingamiskiirus määratakse kindlaks igal proovivõtukorral. Mullaproovidesse segatakse selline glükoosihulk, millest piisab vahetu suurima hingamisreaktsiooni põhjustamiseks. Nimetatud mullaproovis suurima hingamisreaktsiooni põhjustamiseks vajaliku glükoosi hulga saab kindlaks määrata eelkatses, kasutades glükoosi kontsentratsioonide sarja (14). Liivaste muldade puhul, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on 0,5–1,5 %, piisab tavaliselt 2 000–4 000 mg glükoosist mulla kuivmassi kg kohta. Glükoosi võib jahvatada pulbriks koos puhta kvartsliivaga (10 g liiva mulla kuivmassi kg kohta) ja segada ühtlaselt mullaga.

Glükoosiga parandatud mullaproove inkubeeritakse sobivas hingamiskiiruste mõõtmisseadmes kas pidevalt, kord tunnis või kord kahe tunni jooksul (vt punkti 1.6.1) 20 ± 2 °C juures. Vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapnikku mõõdetakse 12 järjestikusel tunnil ning mõõtmisi tuleks alustada nii ruttu kui võimalik, s.t üks-kaks tundi pärast glükoosiga täiendamist. Mõõdetakse vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku üldkoguseid 12 tunni jooksul ja määratakse keskmised hingamiskiirused.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Kui katseid tehakse agrokemikaalidega, tuleks registreerida igas mullaproovi paralleelproovis vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku kogus ja tuleks esitada kõikide paralleelproovide keskmised väärtused tabeli kujul. Süsiniku transformatsiooni kiirusi tuleks hinnata sobivate ja üldiselt heakskiidetud statistiliste meetodite abil (nt F-katse, 5 % olulisusaste). Glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi väljendatakse mg süsinikdioksiidina mulla kuivmassi kg kohta tunnis või mg hapnikuna mulla kuivmassi kg kohta tunnis. Keskmist süsinikdioksiidi tekkekiirust või keskmist hapniku tarbimiskiirust igas katseproovis võrreldakse samade kiirustega kontrollproovis ning arvutatakse katse- ja kontrollproovi vaheline protsentuaalne hälve.

▼B

Kui katseid tehakse muude kui agrokemikaalidega, määratakse kindlaks igas paralleelproovis vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku kogused ning koostatakse annuse-reaktsiooni kõver EC_x väärtuste hindamiseks. Katseproovi glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi (s.t mg süsinikdioksiidi mulla kuivmassi kg kohta tunnis või mg hapnikku mulla kuivmassi kg kohta tunnis) pärast 28 päeva möödumist võrreldakse samade kiirustega kontrollproovis. Nimetatud andmete põhjal arvutatakse protsentuaalsed inhibitsioonivääртused iga katsekontsentratsiooni kohta. Need protsendimäärad registreeritakse kontsentratsioonina ning seejärel kasutatakse statistilisi protseduure EC_x väärtuste arvutamiseks. Usalduspiirid (p = 0,95) arvutatud EC_X puhul määratakse samuti kindlaks standardprotseduuride abil (15, 16, 17).

2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kui hinnatakse agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi ning hingamiskiiruste erinevus madalamate katseaineannuste (mis vastab suurimale eeldatavale kontsentratsioonile) ja kontrollproovide vahel on võrdne või väiksem kui 25 % mis tahes proovivõtuajal pärast 28 päeva möödumist, saab hinnata, et katseaine ei oma pikaajalist toimet süsinikdioksiidi tekkele muldades. Kui muude kemikaalide kui agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi hinnatakse, kasutatakse EC_{50}, EC_{25} ja/või EC_{10} väärtusi.

3. **ARUANDLUS**

3.1 KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Kasutatava mulla täielik identifitseerimine, kaasa arvatud:

— geograafiline viide kohale (laiuskraad, pikkuskraad);

— teave koha ajaloo kohta (s.t taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemine, väetistega töötlemine, juhuslik saastamine jne);

— kasutusviis (nt põllumaa, mets jne);

— proovivõtu sügavus (cm);

— liiva-/aleuriidi-/savisisaldus (protsenti kuivmassist);

— pH (vees);

— orgaanilise süsiniku sisaldus (protsenti kuivmassist);

— lämmastikusisaldus (protsenti kuivmassist);

— katioonvahetusvõime (mmol/kg);

— algne mikroobi biomass protsendina orgaanilise süsiniku koguhulgast;

— viide iga parameetri määramismeetodi kohta;

— kogu teave mullaproovide kogumise ja säilitamise kohta;

— vajaduse korral üksikasjalikud andmed mulla eelinkubeerimise kohta.

▼B

Katseaine:

— füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— vajaduse korral keemilised tunnusandmed, sh struktuurivalem, puhtus (s.t põllukultuuride kaitsevahendite toimeaine protsendimäär), lämmastikusisaldus.

Katsetingimused:

— üksikasjalikud andmed mulla parandamise kohta orgaanilise substraadiga;

— uuritava kemikaali kontsentratsioonide arv ja vajaduse korral valitud kontsentratsioonide põhjendus;

— üksikasjalikud andmed katseaine mulda annustamise kohta;

— inkubatsioonitemperatuur;

— mulla niiskusesisaldus katse alguses ja kestel;

— kasutatav mulla inkubeerimismeetod (koondproovina või üksikute osaproovide sarjana);

— paralleelsete proovide arv;

— proovivõtuajad.

Tulemused:

— hingamiskiiruste mõõtmismeetod ja -seade;

— andmed tabeli kujul, sh süsinikdioksiidi või hapniku üksikud ja keskmised väärtused;

— katse- ja kontrollproovide paralleelproovide vaheline muutus;

— arvutustega tehtud paranduste selgitused, kui on vaja;

— glükoosi põhjustatud hingamiskiiruse protsentuaalne muutus igal proovivõtukorral või vajaduse korral EC_{50} väärtus 95 % usaldusvahemikus, muud EC_x väärtused (s.t EC_{25} või EC_{10}) usaldusvahemikes ning annuse-reaktsiooni kõver;

— vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine;

— kogu teave ja vaatlused, mis aitaksid tõlgendada tulemusi.

4. **VIITED**

1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph Ns 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.

9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

14) Malkomes, H.-P. (1986). EinfluE von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenuber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON MULLAS

1. MEETOD

Käesolev katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 307 (2002).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod põhineb olemasolevatel juhenditel (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud meetod töötati välja kemikaalide aeroobse ja anaeroobse transformatsiooni hindamiseks mullas. Katsete abil määratakse i) katseaine transformatsioonikiirus ja ii) selliste transformatsioonisaaduse laad, mida taimed ja mullaorganismid saavad mõjutada, ning nende moodustumis- ja hävimiskiirus. Sellised uuringud tehakse kemikaalidega, mida levitatakse otse maapinda või mis tõenäoliselt jõuavad mullakeskkonda. Selliste laboriuuringute tulemusi võib samuti kasutada vastavates väliuuringutes kasutatud proovivõtu- ja analüüsiprotokollide koostamisel.

Transformatsiooniteede hindamiseks piisab üldjuhul aeroobsest ja anaeroobsest uuringust ühe pinnasetüübiga (8, 10, 11). Transformatsioonikiirused tuleks kindlaks määrata veel lisaks vähemalt kolmes pinnasetüübis (8, 10).

Käesolevas katses kasutatavate pinnaste arvu ja tüüpide osas lepiti kokku pinnase ja sedimentide valikut käsitlevas OECD töörühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (10). Uuritavad pinnasetüübid peaksid esindama keskkonnatingimusi, kus katseainet kasutatakse või kus vabastamised toimuvad. Näiteks, kemikaale, mis võidakse vabastada subtroopilises kuni troopilises kliimas, tuleks uurida Ferrasoli või Nitosoliga (FAO-süsteem). Töörühm tegi samuti soovitusi seoses mullaproovide kogumise, käsitlemise ja säilitamisega, vastavalt ISO juhendile (15). Käesolevas meetodis võetakse samuti arvesse riisi kasvatamisel kasutatavaid pinnaseid.

1.2. MÕISTED

Katseaine – mis tahes aine, kas lähteühend või vastav transformatsioonisaadus.

Transformatsioonisaadused – kõik katseaine biootilistes või abiootilistes transformatsioonireaktsioonides saadud ained, kaasa arvatud CO_2 ja tooted, mis on seotud jääkides.

Seotud jäägid – pinnases, taimedes või loomades olevad ühendid, mis ekstraheerimise järel säilivad matriitsis lähteainena või selle metaboliidi(metaboliitide)/transformatsioonisaadustena. Ekstraheerimismeetod ei tohiks oluliselt muuta ühendit ennast või matriitsi struktuuri. Sideme olemust saab selgitada osaliselt matriitsi muutva ekstraheerimismeetodi ja täiustatud analüüsitehnikate abil. Tänaseni, näiteks, on sel viisil kindlaks tehtud kovalentsed ioonsidemed ja sorptsioonsidemed ning „lõksud”. Üldiselt vähendab seotud jääkide teke oluliselt bioloogilist kättesaadavust ja bioloogilist omastatavust (12) 1984. aasta IUPAC muudatus (13).

Aeroobne transformatsioon – reaktsioonid, milles osaleb molekulaarne hapnik (14).

▼B

Anaeroobne transformatsioon – reaktsioonid, milles ei osale molekulaarne hapnik (14).

Pinnas – väikeste (peamiselt mikro)organismide poolt orgaaniliseks muudetav segu mineraalsetest ja orgaanilistest keemilistest koostisainetest, mis hiljem sisaldab kõrge süsiniku- ja lämmastikusisaldusega ning suure molekulmassiga ühendeid. Pinnast võib töödelda kahes eri seisundis:

a) looduspärane, nagu see on aja jooksul arenenud pinnasetüüpide erinevateks iseloomulikeks kihtideks;

b) häiritud, nagu see on tavaliselt esineb viljeluspõldudel või käesolevas meetodis kasutamiseks kaevatud proovides (14).

Mineralisatsioon – orgaanilise ühendi täielik lagunemine CO_2-ks ja H_2O-ks aeroobsetes tingimustes ning CH_4-ks, CO_2-ks ja H_2O-ks anaeroobsetes tingimustes. Käesoleva katsemeetodi kontekstis, kui kasutatakse ^{14}C-märgistatud ühendit, tähendab mineralisatsioon ulatuslikku lagundamist, mille käigus märgistatud süsinikuaatom oksüdeerub ning vabaneb sobiv kogus $^{14}CO_2$ (14).

Poolestusaeg – $t_{0,5}$ on aeg, mis kulub katseaine 50 %liseks transformatsiooniks, kui transformatsiooni saab kirjeldada esimese astme kineetika abil; poolestusaeg ei sõltu kontsentratsioonist.

DT_{50} (hävimisaeg 50) – aeg, mille jooksul katseaine kontsentratsiooni vähendatakse 50 % võrra; see on erinev poolestusajast $t_{0,5,}$ mil transformatsioon ei järgi esimese astme kineetikat.

DT_{75} (hävimisaeg 75) – aeg, mille jooksul katseaine kontsentratsiooni vähendatakse 75 % võrra.

DT_{90} (hävimisaeg 90) – aeg, mille jooksul katseaine kontsentratsiooni vähendatakse 90 % võrra.

1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusaineid tuleks kasutada transformatsioonisaaduste iseloomustamiseks ja/või identifitseerimiseks spektroskoopiliste ja kromatograafiliste meetodite abil.

1.4. KATSE KOHALDAMISALA

Meetodit kohaldatakse kõikide keemiliste ainete suhtes (märgistamata või radiomärgistatud, mille kohta on olemas piisavalt täpne ja tundlik analüüsimeetod. See on kohaldatav kergelt lenduvate, mittelenduvate, veeslahustuvate või vees mittelahustuvate ühendite suhtes. Katset ei kohaldata kemikaalide suhtes, mis kergesti lenduvad pinnasest (nt fumigandid, orgaanilised lahustid) ja seega ei saa seda hoida pinnases käesolevates katsemeetodites.

▼B

1.5. TEAVE KATSEAINE KOHTA

Märgistamata või märgistatud katseainet saab kasutada transformatsioonikiiruse mõõtmiseks. Märgistatud materjal on nõutav transformatsioonitee uurimiseks ja ainetaseme määramiseks. ^{14}C-märgistust soovitatakse, kuid muude isotoopide (näiteks ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P) kasutamine võib olla samuti kasulik. Niipalju kui võimalik tuleks märgistus asetada molekuli kõige stabiilsemale) osa(de) külge ([1]). Katseaine puhtus peaks olema vähemalt 95 %.

Enne pinnases aeroobset ja anaeroobset transformatsiooni käsitleva katse tegemist peaks olema katseaine kohta kättesaadaval järgmine teave:

a) lahustuvus vees (meetod A.6);

b) lahustuvus orgaanilistes lahustites;

c) aururõhk (meetod A.4) ja Henry konstant;

d) n-oktanooli/vee jaotustegur (meetod A.8);

e) keemiline stabiilsus pimedas (hüdrolüüs) (meetod C.7);

f) pK_a, kui molekulil on kalduvus protoneerumisele või deprotoneerumisele (OECD juhend 112) (16).

Muu vajalik teave võib sisaldada andmeid katseaine mürgisuse kohta mullamikroobide suhtes (katsemeetodid C.21 ja C.22) (16).

Katseaine ja selle transformatsioonisaaduste kvantifitseerimise ja identifitseerimise analüüsimeetodid (sh ekstraheerimis- ja puhastamismeetodid) peaksid olema kättesaadavad.

1.6. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Mullaproove töödeldakse katseainega ja inkubeeritakse pimedas Erlenmeyer kolbides või möödavoolusüsteemides kontrollitud laboritingimustes (konstantse temperatuuri ning pinnaseniiskuse juures). Pärast sobivaid ajavahemikku ekstraheeritakse mullaproovid ja neid analüüsitakse lähteaine ja transformatsioonisaaduste suhtes. Lenduvad saadused kogutakse samuti analüüsiks sobivate absorbtsiooniseadmete abil. Kasutades ^{14}C-märgistusega materjali, saab mõõta katseaine erinevaid mineralisatsioonikiiruseid eraldunud $^{14}CO_2$ kinni püüdes, ning saab määrata ainetaseme, sh pinnases seotud jäägid.

1.7. KVALITEEDIKRITEERIUMID

1.7.1. **Saagis**

Vähemalt kahe mullaproovi ekstraheerimine ja analüüs kohe katseaine lisamise järel annab esimesi märke analüüsimeetodi korratavuse kohta ning katseaine manustamise ühtsuse kohta Saagised katse hilisematelt etappidelt on saadud vastavatelt ainetasemetelt. Saagised peaksid jääma vahemikku 90–110 % märgistatud kemikaalide puhul (8) ja 70–110 % märgistamata kemikaalide puhul (3).

([1]) Näiteks, kui katseaine sisaldab ühte rõngast, on nõutav see märgistada; kui katseaine sisaldab kahte või enamat rõngast, võib vaja minna eraldi uuringuid kummagi märgistatud rõnga säilimise hindamiseks ja sobiva teabe saamiseks transformatsioonisaaduste tekke kohta.

▼B

1.7.2. **Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus**

Analüüsimeetodi korratavust (v.a alguses tehtud ektraheerimise tõhusus) katseaine ja transformatsiooni saaduste kvantifitseerimiseks saab kontrollida, korduvanalüüsides samast pinnasest tehtud ekstrakti, mida on inkubeeritud seni, kuni tekivad transformatsioonisaadused.

Katseaine ja transformatsioonisaaduste puhul on analüüsimeetodi avastamislävi (LOD) peaks olema vähemalt 0,01 mg-kg^{-1} mullaproovi (katseainena) või 1 % kasutatud annusest, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kvantifikatsioonilävi (LOQ) tuleks samuti määrata.

1.7.3. **Transformatsioonist saadud andmete täpsus**

Katseaine kontsentratsioonide regressioonanalüüs ajafunktsioonina annab vajalikku teavet transformatsioonikõvera usaldusväärsuse kohta ning võimaldab arvutada poolestusaegade usalduspiire (näilise esimese astme kineetika puhul) või DT_{50} väärtused ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} väärtused.

1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.8.1. **Seadmed ja keemilised reaktiivid**

Inkubatsioonisüsteemid võivad olla staatiliselt suletud süsteemid või sobivad möödavoolusüsteemid (7, 17). Näited mullaproovide inkubatsioonil kasutatava möödavooluseadme ja Erlenmeyeri kolvi kohta on esitatud vastavalt joonistel 1 ja 2. Mõlemat tüüpi inkubatsioonisüsteemidel on eelised ja puudused (7, 17).

Nõutavad on standardsed laboriseadmed, eriti järgmised:

— analüütilised seadmed, näiteks GLC, HPLC, TLC-seadmed, kaasa arvatud radiomärgistatud või märgistamata ainete analüüsimisel kohaldatavad avastamissüsteemid või pööratud isotoopide lahjendusmeetod;

— identifitseerimisel kasutatavad seadmed (nt MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR jne);

— vedelikstsintsillaatsioonloendur;

— oksüdeerija radioaktiivsete ainete põletamiseks;

— tsentrifuug;

— ekstraheerimisseade (nt tsentrifuugiküvetid külmekstraheerimiseks ja Soxhlet' seade pidevekstraheerimiseks püstjahuti all);

— lahuste ja ekstraktide kontsentreerimise seadmed (nt pöördaurusti);

— veevann;

— mehaaniline segamisseade (nt sõtkumismasin, pöörlev segisti).

▼B

Kasutatud keemilised reaktiivid, näiteks:

— NaOH, analüütiliselt puhas, 2 mol· dm^{-3}, või muu sobiv alus (nt KOH, etanoolamiin);

— H^2SO^4, analüütiliselt puhas, 0,05 mol· dm^{-3};

— etüleenglükool, analüütiliselt puhas;

— tahked absorbtsioonimaterjalid, nt naatronlubi ja polüuretaan-küünlad;

— orgaanilised lahustid, analüütiliselt puhtad, nt atsetoon, metanool jt;

— stsintsillatsioonvedelik.

1.8.2. **Katseaine annustamine**

Mullaproovi lisamiseks või levitamiseks võib katseainet lahustada vees (deioniseeritud või destilleeritud) või vajaduse korral väheses koguses atsetoonis või muudes orgaanilistes lahustites (6), milles katseaine on piisavalt lahustuv ja stabiilne. Valitud lahusti kogusel ei peaks siiski olema olulist mõju mulla mikroobsele aktiivsusele (vt punkte 1.5 ja 1.9.2–1.9.3 Selliste mikrobioloogilist aktiivsust inhibeerivate lahustite nagu kloroform, diklorometaan ja muud halogeenitud lahustid kasutamist tuleks vältida.

Katseainet võib samuti lisada tahkel kujul, nt segatud kvartsliivaga (6) või mullaproovide väikeste osaproovidena, mida on õhkkuivatatud ja steriliseeritud. Kui katseainet lisatakse lahusti abil, tuleks lasta lahustil aurustuda enne katseainet sisaldava osaproovi lisamist algupärasesse ebasteriilsesse mullaproovi.

Üldkemikaalide puhul, mis sisenevad mulda üldiselt reoveesetete kaudu või põllumajanduslikul kasutamisel, tuleks katseainet esmalt lisada reovette, mida seejärel annustatakse mullaproovi (vt punkte 1.9.2 ja 1.9.3).

Preparaatide kasutamist tavaliselt ei soovitata. Nt nõrgalt lahustuva katseaine puhul võib siiski kasutada preparaati sobiva alternatiivina.

1.8.3. **Pinnased**

1.8.3.1. *Pinnase valik*

Transformatsioonitee kindlaksmääramisel võib kasutada representatiivset pinnast; soovitav pinnasetüüp on saviliiv või liivsavi või savi või savine liiv (vastavalt FAO ja USDA klassifikatsioonile (18)), mille pH on 5,5–8,0, orgaanilise süsiniku sisaldus on of 0,5–2,5 % ja mikroobi biomass on vähemalt 1 % orgaanilise süsiniku koguhulgast (10).

Transformatsioonitee määramisel tuleks uurida vähemalt kolme representatiivset pinnast. Pinnaste orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, savi sisaldus ja mikroobi biomass on erinevad (10).

▼B

Kõiki pinnaseid tuleks iseloomustada vähemalt nende tekstuuri (liiva, aluerüdi, savi (protsentides)) (vastavalt FAO ja USDA klassifikatsioonile (18)), pH, katioonvahetusvõime, orgaanilise süsiniku, lasuvustiheduse, veeläbilaskvusvõime ([1]) ja mikroobi biomassi poolest (üksnes aeroobsetes uuringutes). Tulemuste tõlgendamisel võib osutuda kasulikuks lisateave pinnaseomaduste kohta. Pinnaseomaduste kindlaksmääramiseks saab kasutada viidetes (19, 20, 21, 22, 23) soovitatud meetodeid. Mikroobi biomass tuleks määrata substraadi indutseeritud hingamise (SIR) meetodi (25, 26) või alternatiivsete meetodite abil (20).

1.8.3.2. *Mullaproovide kogumine, käsitlemine ja säilitamine*

Üksikasjalik teave proovikogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjade hulka kuuluvad täpne asukoht, taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemise kuupäevad, orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega töötlemine, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine. Kui pinnaseid on juba töödeldud katseainega või selle struktuursete analoogidega viimase nelja aasta jooksul, ei tuleks neid kasutada transformatsiooni uuringutel (10, 15).

Muld peaks olema värskelt kogutud põllult (A-horisondilt või ülemisest 20 cm kihist), ning selle veesisaldus peaks olema selline, et hõlbustaks sõelumist. Muude muldade kui riisipõldude muldade puhul tuleks vältida proovide võtmist pikkade (> 30 päeva) põua-, külmumis- või üleujutusperioodide jooksul või vahetult pärast neid (14). Proove tuleks transportida nii, et muutused mulla veesisalduses oleksid minimaalsed ja neid tuleks hoida pimedas võimalikult vaba õhujuurdepääsuga. Nõrgalt seotud polüetüleenkott on üldiselt selleks piisav.

Mulda tuleks töödelda nii ruttu kui võimalik pärast proovivõtmist. Taimed, suurem mullafauna ja kivid tuleks eemaldada enne mulla sõelumist läbi 2 mm sõela, mis eemaldab väikesed kivid, fauna ja taimejäätmed. Tuleks vältida mulla ulatuslikku kuivatamiste ja purustamist enne sõelumist (15).

Kui põllult proovide võtmine on raske talvel (pinnas on külmunud või kaetud lumekihtidega), võib proove võtta mullapartiist, mida säilitatakse kasvuhoones taimkatte all (nt rohu või rohu-ristikheina segu all). Väga on eelistatud uuringud värskelt põllult kogutud muldadega, kuid kui kogutud ja töödeldud mulda tuleb säilitada enne uuringu algust, peavad säilitamistingimused olema piisavad ja üksnes piiratud aja jooksul (4 ± 2 °C maksimaalselt kolm kuud), et säiliks mikroobne aktiivsus ([2]). Üksikasjalikud juhendid selliste mullaproovide kogumiseks, käsitlemiseks ja säilitamiseks, mida kasutatakse biotransformatsioonikatsetes, on toodud viidetes (8, 10, 15, 26, 27).

([1]) Pinnase veeläbilaskvusvõimet saab mõõta väliveemahutavusena, veemahutavuse või imirõhuna (pF). Selgitused on liites 1. Katseprotokollis tuleks edastada, kas pinnase veeläbilaskvusvõime ja lasuvustihedus määrati kindlaks looduspärastes väliproovides või häiritud (töödeldud) proovides.

([2]) Viimased uurimistulemused viitavad sellele, et parasvöötmes kogutud mullaproove saab samuti säilitada –20 °C juures üle kolme kuu (28, 29) mikroobide aktiivsust oluliselt häirimata.

▼B

Enne töödeldud pinnase kasutamist katses, tuleks seda eelinkubeerida, et lasta seemnetel idaneda ja saaks need eemaldada ning taastada mikroobide ainevahetuse tasakaal pärast proovivõtu- ja säilitamistingimuste muutumist inkubatsioonitingimusteks. 2–28 päeva vahel toimuv eelinkubeerimine ligikaudu samadel temperatuuri ja niiskuse tingimustel nagu tegelikus katseski on üldiselt piisav (15). Säilitamis- ja eelinkubeerimisperioodid kokku ei tohiks ületada kolme kuud.

1.9. KATSE KÄIK

1.9.1. **Katsetingimused**

1.9.1.1. *Katsetemperatuur*

Kogu katseperioodi jooksul tuleks mullaproovid inkubeerida pimedas konstantsel temperatuuril, mis vastab kliimatingimustele, kus katseainet kasutati või kus toimus vabastamine. Kõikide parasvöötmes pinnasesse jõudvate katseainete puhul on soovitav temperatuur 20 ± 2 °C. Temperatuuri tuleks jälgida.

Kemikaalide puhul, mida kasutatakse või mis vabanevad külmemas kliimas (nt põhjamaades, sügis/talveperioodil), tuleks inkubeerida lisaproove, kuid madalamal temperatuuril (nt 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Niiskusesisaldus*

Aeroobsetes tingimustes transformatsioonikatsete puhul tuleks mulla niiskusesisaldust ([1]) reguleerida ja säilitada pF vahemikus 2,0–2,5 (3). Mulla niiskusesisaldust väljendatakse veemassina kuiva mulla massi kohta ja seda tuleks korrapäraselt kontrollida (nt kahenädalaste intervallide tagant), kaaludes inkubatsioonikolbe ja veekadusid, mida täiendatakse vee lisamise teel (eelistatavalt steriilne filtreeritud kraanivesi). Tuleks püüda vältida või vähendada katseaine ja/või transformatsioonisaaduste kadu lendumise ja/või fotolagundamise (kui see juhtub) kaudu vedeliku lisamise käigus.

Anaeroobsetes tingimustes transformatsioonikatsete käigus küllastatakse pinnast veega üleujutamise teel.

1.9.1.3. *Aeroobsed inkubatsioonitingimused*

Möödavoolusüsteemides säilitatakse aeroobsed tingimused vahelduva loputamise või pidevalt niisutatud õhuga ventileerimise teel. Erlenmeyeri kolbides tagatakse õhuvahetus difusiooni abil.

1.9.1.4. *Steriilsed aeroobsed tingimused*

Katseaine abiootilise transformatsiooni olulisuse kohta käiva teabe saamiseks võib mullaproovid steriliseerida (steriliseerimismeetodid on viidetes 16 ja 29), töödelda steriilse katseainega (nt lahuse lisamine läbi steriilse filtri) ja tuulutada niisutatud steriilse õhuga, nagu on kirjeldatud punktis 1.9.1.3. Riisipõldude mullaproovide puhul tuleks pinnast ja vett steriliseerida ja inkubeerida tuleks vastavalt punktile 1.9.1.6.

([1]) Mullaproov ei tohiks kunagi olla liiga märg või liiga kuiv, et säiliks mulla mikrofloora piisav ohutus ja toitumine. Soovituslikud niiskusesisaldused optimaalseks mikroobi kasvuks on 40–60 % veemahutavusest (WHC) ja 0,1–0,33 baari (6). Viimane vahemik on sama, mis 2,0–2,5 pF-vahemik. Erinevatele mullatüüpidele omased niiskusesisaldused on toodud 2. liites.

▼B

1.9.1.5. *Aneroobsed inkubatsioonitingimused*

Anaeroobsete tingimuste loomiseks ja säilitamiseks katseainega töödeldud ja aeroobsetes tingimustes 30 päeva või ühe poolestusaja jooksul või DT_{50} ajal (olenevalt sellest, milleks kulub vähem aega) inkubeeritud pinnast küllastatakse seejärel veega (1–3 cm veekiht) ja inkubatsioonisüsteemi loputatakse inertse gaasiga (nt lämmastik või argoon) ([1]). (2) Katsesüsteem peab võimaldama järgmiseid mõõtmisi: pH, hapniku kontsentratsiooni ja redokspotentsiaali mõõtmised, ja sisaldama lenduvate saaduste püüdmise seadmeid. Erlenmeyeri kolbidest koosnev süsteem tuleb sulgeda, et vältida õhu sisenemist difusiooni teel.

1.9.1.6. *Niiske põllu mullaproovide inkubatsioonitingimused*

Riisipõllu mullaproovide transformatsiooni uurimisel ujutataks pinnas üle ligikaudu 1–5 cm veekihiga ja katseainet annustatakse veefaasi (9). Soovitav pinnasesügavus on vähemalt 5 cm. Süsteemi õhutatakse samamoodi nagu aeroobsetel tingimustel. Veekihi pH, hapniku kontsentratsiooni ja redokspotentsiaali tuleks jälgida ja sellest teatada. Vähemalt kahenädalane eelinkubatsiooniperiood on vajalik enne transformatsiooniuuringutega alustamist (vt punkt 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Katse kestus*

Kiirust ja transformatsiooniteed käsitlevad uuringud ei tohiks tavaliselt ületada 120 päeva ([2]) (3, 6, 8), kuna seejärel eeldatakse, et väheneb mulla mikroobne aktiivsus tehislaborisüsteemis, kus ei täiene looduslikult toitainetagavarad. Kui katseaine vähenemist ja peamiste transformatsioonisaaduste teket ja vähenemist on vaja kirjeldada, tuleks uuringuid jätkata pikema aja jooksul (nt 6 või 12 kuud) (8). Pikemaid inkubatsiooniperioode tuleks põhjendada katseprotokollis ja sellele tuleks lisada biomassi mõõtmised nimetatud perioodide kestel ja lõpus.

1.9.2. **Katse käik**

Ligikaudu 50–200 g mulda (kuivmassina) asetatakse iga inkubatsioonikolvi põhja (vt 3. liites jooniseid 1 ja 2) ning mulda töödeldakse katseainega ühe punktis 1.8.2 kirjeldatud meetodi abil. Kui orgaanilisi lahusteid kasutatakse katseaine annustamiseks, tuleks need eemaldada mullast aurustamise teel. Seejärel segatakse muld hoolikalt spaatliga ja/või kolvi raputamise teel. Kui uuring tehakse niiskete põldude tingimustes, tuleks mulda ja vett hoolikalt segada pärast katseaine lisamist. Väikeseid töödeldud muldade alikvoote (nt 1 g) tuleks analüüsida katseaine ühtlase jaotuse kontrollimiseks. Alternatiivne meetod on toodud allpool.

([1]) Aeroobsed tingimused domineerivad pindmises mullakihis ja isegi aluspõhjas, nagu on näidatud ELi rahastatud uurimisprojektis (K. Takagi *et al*. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internal. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol, 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden). Anaeroobsed tingimused võivad esineda vaid juhuslikult pinnaste üleujutuste käigus pärast tugevaid sademeid või siis, kui on loodud niiske põllumajanduse tingimused riisipõldudel.

([2]) Aeroobsed uuringud tuleks lõpetada palju varem kui 120 päeva, tingimusel et selgelt on selleks ajaks jõutud lõpliku transformatsiooniteeni ja lõpliku mineralisatsioonini. Katse lõpetamine on võimalik pärast 120 päeva või siis, kui vähemalt 90 % katseainest transformeeritakse, kuid tekkis ainult 5 % CO_2.

▼B

Annustatav kogus peaks vastama põllukultuuride kaitsevahendite kasutusjuhendites soovitatud suurimale annusele ja ühtset levimist sobivasse sügavusse (nt ülemisse 10 cm mullakihti ([1]). Näiteks, kemikaalide puhul, mis levivad taimede lehtedesse või pinnasesse ilma, et need tungiksid taimedesse, sobiv sügavus selle arvutamiseks, kui palju kemikaali tuleks igasse kolbi lisada, on 2,5 cm. Pinnasesse tunginud kemikaalide puhul on sobiv sügavus kasutusjuhendis täpsustatud tungimissügavus. Üldkemikaalide puhul tuleks hinnata annustamist kõige sobivama pinnasesse tungimise tee põhjal, näiteks, kui peamine pinnasesse tungimise tee on läbi reoveesetete, tuleks kemikaali annustada reovette kontsentratsioonis, mis vastab oodatud reovee kontsentratsioonile, ja pinnasesse lisatud reovee hulk peaks vastama tavalisele põllumajanduses kasutatavate pinnaste reovee määrale. Kui see kontsentratsioon ei ole piisavalt suur peamiste transformatsioonisaaduste identifitseerimiseks, võib olla abiks erinevate suuremaid kontsentratsioone sisaldavate mullaproovide inkubeerimine, kuid tuleks vältida liiga suuri annusmäärasid, mis võivad mõjutada mulla mikroobide funktsioone (vt punkte 1.5 ja 1.8.2).

Alternatiivselt saab katseainega töödelda suuremat mullakogust (s.t 1–2 kg), seda hoolikalt segades sobiva segamisseadme abil ja seejärel asetades need väikeste, 50–200 g osadena inkubatsioonikolbidesse (nt proovijaoturite abil) Väikeseid töödeldud muldade alikvoote (nt 1 g) tuleks analüüsida katseaine ühtlase jaotuse kontrollimiseks. Sellist protseduuri eelistatakse, kuna see võimaldab ühtlasemalt katseainet pinnasesse jagada.

Samuti inkubeeritakse töötlemata mullaproove samadel tingimustel (aeroobsed) nagu katseainega töödeldud proove. Nimetatud proove kasutatakse biomassi mõõtmistel uuringu käigus ja lõpus.

Kui katseainet lisatakse pinnasesse lahjendatuna orgaanilis(t)es lahusti(te)s, inkubeeritakse sama koguse lahusti(te)ga töödeldud mullaproove samadel tingimustel (aeroobsed) kui katseainega töödeldud mullaproove. Nimetatud proove kasutatakse biomassi mõõtmistel uuringute alguses, kestel ja lõpus lahusti(te) mõjude kontrollimiseks mikroobi biomassi suhtes.

Töödeldud mullaproove sisaldavad kolvid kas kinnitatakse mööda-voolusüsteemi, mida on kirjeldatud joonisel 1, või suletakse absorbtsioonikolonni, mis on toodud joonisel 2 (vt 3. liidet).

([1]) Järgmise võrrandi abil arvutatakse lähtekontsentratsioon pindala põhjal:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = lähtekontsentratsioon mullaproovis [$mg \cdot kg^{-1}$]
A = annustamine [$kg \cdot ha^{-1}$]; l = mullakihi paksus uuritavas keskkonnas [m]; d = kuivlasuvustihedus [$kg \cdot m^{-3}$].
Resikareegel on, et annustamisel 1 kg ha^{-1} saadakse pinnase kontsentratsiooniks kigikaudu 1 mg kg^{-1} kihis (oletades, et lasuvustihedus on 1 $g \cdot cm^{-3}$).

▼B

1.9.3. **Proovide võtmine ja mõõtmine**

Paralleelsed inkubatsioonikolvid eemaldatakse sobiva ajavahemiku tagant ja mullaproovid ekstraheeritakse erineva polaarsusega lahustitega ning analüüsitakse katseaine ja/või transformatsioonisaaduste osas. Hästi väljatöötatud uuringus on piisavalt kolbe, et igal proovivõtukorral kasutatakse kahte kolbi. Samamoodi eemaldatakse absorbtsioonilahused või tahked absorbtsioonimaterjalid erinevate ajavahemike tagant (seitsmepäevane intervallid esimese kuu jooksul ja pärast ühe kuu möödumist 17päevased intervallid) iga mullaproovi inkubatsiooni kestel ja lõpus ning analüüsitakse lenduvate saaduste osas. Kohe katseaine manustamise järel (0-päeva proov) võetud mullaproovile lisaks tuleks katsetesse lisada vähemalt viis erinevat proovivõtukohta. Ajavahemikud tuleks valida nii, et katseaine vähenemisaegu ning transformatsioonisaaduste tekke- ja vähenemisaegu saaks määrata (nt 0, 1, 3, 7 päeva; 2, 3 nädalat; 1, 2, 3 kuud jne).

Kasutades ^{14}C-märgistusega katseainet, ekstraheerimata radioaktiivsete ainete määr määratakse põlemise teel ja ainetase arvutatakse iga proovivõtuaja kohta.

Anaeroobsete ja niiske põllu proovide korral mulla- ja veefaase ning katseaine ja transformatsioonisaaduseid analüüsitakse või eraldatakse filtreerimise või tsentrifuugimise teel enne ekstraheerimist ja analüüsi.

1.9.4. **Valikkatsed**

Aeroobsetes, mittesteriilsetes uuringutes, milles kasutatakse muid temperatuure ja mullaniiskust, võib hinnata pinnase temperatuuri ja niiskuse mõju katseaine ja/või selle transformatsioonisaaduste transformatsioonikiirust pinnases.

Ekstraheerimata radioaktiivseid aineid võib lisaks proovida kirjeldada näiteks ülikriitilisel vedeliku ekstraheerimisel.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Katseaine, transformatsioonisaaduste, lenduvate ainete (vaid protsendina) ja ekstraheerimata ainete kogused tuleks esitada protsendina lähtekontsentratsioonist ja vajaduse korral $mg \cdot kg^{-1}$ mullaproove (tahke kuivmass) igas proovivõtuvahemikus. Ainetase tuleks esitada protsendina lisatud lähtekontsentratsioonist igas proovivõtuvahemikus. Katseaine graafiline esitamine aja funktsioonina aitab hinnata transformatsiooni poolestusaega või DT_{50}. Peamised transformatsioonisaadused tuleks identifitseerida ja nende kontsentratsioonid tuleks esitada aja funktsioonina, et näidata nende tekke- ja vähenemiskiirust. Peamised transformatsioonisaadused on mis tahes saadused, mida esineb igal ajahetkel uuringu käigus ≥10 % katseaine annusest.

Kinnipüütud lenduvad ained annavad märke selle kohta, et katseaine ja selle transformatsioonisaaduste võimest pinnasest lenduda.

▼B

Sobivate kineetilise mudeli kohaste arvutuste põhjal peaks saama täpsemalt määrata poolestusajad või DT_{50} väärtused ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} väärtused. Poolestusajad ja DT_{50} väärtused tuleks teatada koos kasutatava mudeli, kineetika astme ja määramiskoefitsiendi (r^2) kirjeldusega. Esimese astme kineetika on soositud, välja arvatud juhul, kui $r^2 < 0,7$. Vajaduse korral tuleks arvutused teha peamiste transformatsioonisaaduste kohta. Sobivate mudelite näiteid kirjeldatakse viidetes 31–35.

Uurides erinevatel temperatuuridel kiiruseid, tuleks kirjeldada transformatsioonikiirust temperatuuri funktsioonina katsetemperatuuri vahemikus, kasutades Arrheniuse võrrandit kujul:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } lnk = 1nA - \frac{B}{T},$$

kus In A ja B on kõige sobivama joone lõikepunktist ja tõusust saadavad regressioonkonstandid, mis saadakse ln k ja 1/T lineaarse regressioonanalüüsi tulemusena, k on kiirusekonstant temperatuuril T ja T on temperatuur Kelvini järgi. Kui transformatsiooni reguleerib mikroobide tegevus, tuleks võtta arvesse piiratud temperatuurivahemikku, milles Arrheniuse võrrand kehtib.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Kuigi uuringuid tehakse tehislaboritingimustes, saab tulemuste põhjal hinnata katseaine transformatsioonikiirust ja samuti transformatsioonisaaduste tekke- ja vähenemiskiirust välitingimustes (36, 37).

Katseaine transformatsioonitee uuring annab teavet selle kohta, kuidas lisatud ainet struktuur pinnases muutub keemiliste ja mikroobsete reaktsioonide abil.

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

— üldnimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (tuues ära märgi/märkide asukoha, kui kasutatakse radiomärgistatud ainet) ja asjaomased füüsikalis-keemilised omadused (vt punkti 1.5);

— katseaine puhtus (lisandid);

— märgistatud kemikaali radiokeemiline puhtus ja spetsiifiline aktiivsus (vajaduse korral).

Võrdlusained:

— selliste võrdlusainete keemiline nimetus ja struktuur, mida kasutatakse transformatsioonisaaduste kirjeldamiseks ja/või identifitseerimiseks.

Katsepinnased:

— üksikasjalikud andmed kogumiskoha koha;

— mullaproovide võtmise kuupäev ja protseduur;

▼B

— pinnase omadused, nt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, tekstuur (liiva-, aleuriidi-, saviprotsent), katioonvahetusvõime, lasuvustihedus, veeläbilaskvusvõime ja mikroobi biomass;

— mullaproovide säilitamise kestus ja tingimused (kui need säilitatakse).

Katsetingimused:

— uuringute tegemise kuupäevad;

— lisatud katseaine kogus;

— kasutatud lahustid ja katseaine lisamise meetod;

— töödeldud mullaproovide lähtemass ja nende mass analüüsi igal proovivõtukorral;

— kasutatud inkubatsioonisüsteemi kirjeldus;

— õhu voolukiirus (üksnes möödavoolussüsteemides);

— katsesüsteemi temperatuur;

— mullaproovide niiskusesisaldus inkubatsiooni ajal;

— mikroobi biomass aeroobse uuringu alguses, kestel ja lõpus;

— pH, hapniku kontsentratsioon ja redokspotentsiaal anaeroobsete ja niiske põllumaa uuringute alguses, kestel ja lõpus;

— ekstraheerimismeetod;

— katseaine ja peamiste transformatsioonisaaduste kvantifitseerimis- ja identifitseerimismeetodid mullaproovides ning ja absorbtsioonimaterjalides;

— paralleelproovide arv ja kontrollproovide arv.

Tulemused:

— mikroobide tegevuse määramistulemus;

— kasutatud analüüsimeetodite korratavus ja tundlikkus;

— saagisemäärad (valiidse katse protsendimäärad on toodud punktis 1.7.1);

— tulemused tabeli kujul, väljendatuna protsendina lähteannusest ja vajaduse korral $mg \cdot kg^{-1}$ mullaproovi (kuivmass);

— ainetase uuringute kestel ja lõpus;

— pinnase ekstraheerimata (seotud) radioaktiivsuse või jääkide iseloomustamine;

— vabanenud CO_2 ja muude lenduvate ühendite kvantifitseerimine;

— katseaine ja vajaduse korral transformatsioonisaaduste kontsentratsioonid mullaproovis esitatud aja funktsioonina;

— katseaine ja vajaduse korral transformatsioonisaaduste poolestusaeg või DT_{50}, DT_{75} ja DT_{90} väärtused usaldusvahemikes;

▼B

— hinnang abiootilise lagunemise kiirusele steriilsetes tingimustes;

— hinnang katseaine ja vajaduse korral peamiste transformatsioonisaaduste transformatsioonikineetika kohta;

— vajaduse korral eeldatavad transformatsiooniteed;

— tulemuste arutelu ja tõlgendamine;

— töötlemata tulemused (s.t proovide kromatogrammid, transformatsioonikiirust käsitlevad arvutused ja transformatsioonisaaduste identifitseerimiseks kasutatavad vahendid).

4. **VIITED**

1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex HI, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in sou, water and air.

5) BBA (1986). Richtlinie fur die amtliche Prufung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

7) ISO 14239 (1997). Soil Quality- Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.

12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼B

15) ISO 10381-6 (199 3). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

16) Annex V to Dir. 67/548/EEC.

17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 3 3, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

22) Muckenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215–221.

25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45–60.

27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16 Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105–120.

28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59–63 (SETAC-Europe).

29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjodahl-Svensson K., Stenstrom J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68–69 (SETAC-Europe).

30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197–200.

31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Fesdegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B

32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181–199.

33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135–172.

34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, 188–204.

35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47–60.

36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032–1041.

37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83–122.

▼B

1. liide

VEEPINEVUS, VÄLIVEEMAHUTAVUS (FC) JA VEEMAHUTAVUS (WHC) [1]

Veesamba kõrgus (cm)	pF [a]	baar [b]	Märkused
10^7	7	10^4	Kuiv pinnas
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Närbumispiir
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Väliveemahutavuse ala [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (hinnang)
1	0	0,001	Veega küllastatud pinnas

[a] pF = veesamba kõrguse (cm) logaritm.
[b] 1 baari = 10^5 Pa.
[c] Vastab ligikaudsele 10 %lisele veesisaldusele liivas, 35 %lisele mudas ja 45 %lisele savis.
[d] Väliveemahutavus ei ole konstantne, vaid see varieerub vastavalt mulla tüübile pF 1,5 ja 2,5 vahel.

Veepinevust mõõdetakse veesamba kõrgusena (cm) või baarides. Imirõhu laia ulatuse tõttu väljendatakse seda üksnes pF väärtusena, mis vastab veesamba logaritmile.

Väliveemahutavus on määratletud veehulgana, mida võib säilitada atmosfäärirõhus looduspinnases 2 päeva pärast pikemat vihmaperioodi või pärast piisavat kastmist. See määratakse looduspärases pinnases *in situ* põllul. Mõõtmist seega ei kohaldata pinnase häiritud laboriproovides. Häiritud mullaproovides määratud FC väärtused võivad esindada suuri süsteemseid muutusi.

Veemahutavus (WHC) määratakse kindlaks laboris looduspärases või häiritud mullas, küllastades mullasammast veega kapillaartranspordi teel. See on eriti kasulik häiritud mullaproovide teel ja võib olla kuni 30 % suurem kui väliveemahutavus (^{239}). Samuti võib olla seda katseliselt kergem määrata kui usaldusväärseid FC-väärtusi.

Märkused

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

2. liide

ERINEVATEST RIIKIDEST ERINEVATEST MULLATÜÜPIDEST VÕETUD MULLAPROOVIDE NIISKUSESISALDUS (g vett 100 g kuiva pinnase kohta)

Mullatüüp	Riik	Niiskusesisaldus		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Liiv	Saksamaa	28,7	8,8	3,9
Mudane liiv	Saksamaa	50,4	17,9	12,1
Mudane liiv	Šveits	44,0	35,3	9,2
Aleuriitne muda	Šveits	72,8	56,6	28,4
Savimuda	Brasiilia	69,7	38,4	27,3
Savimuda	Jaapan	74,4	57,8	31,4
Liivane muda	Jaapan	82,4	59,2	36,0
Aleuriitne muda	Ameerika Ühendriigid	47,2	33,2	18,8
Liivane muda	Ameerika Ühendriigid	40,4	25,2	13,3

([1]) Veemahutavus.

▼B

3. liide

Joonis 1

Näide möödavooluseadmest, mida kasutatakse kemikaalide transformatsiooni uurimisel pinnases ([1]) ([2])

1: nõelventiil

2: vett sisaldavad gaasipesupudelid

3: ultramembraan (üksnes steriilsed tingimused), poori suurus 0.2 µm

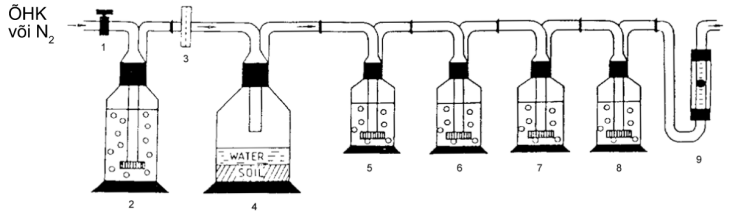
4: pinnase ainevahetuse kolb (veega küllastatud üksnes anaeroobsetes ja niiske põllumaa tingimustes)

5: etüleenglükoollõks orgaaniliste lenduvate ühendite jaoks

6: väävelhappelõks leeliseliste lenduvate ühendite jaoks

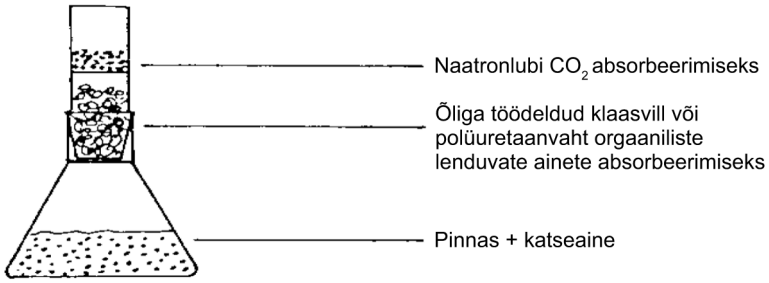
7, 8: naatriumhüdroksiidilõks CO_2 ja muude happeliste lenduvate ainete jaoks

9: voolumõõtur.



Joonis 2

Näide Erlenmeyeri kolvist, mida kasutatakse kemikaalide transformatsiooni uurimisel pinnases ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

C.24. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON PÕHJASETTES

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 308 (2002).

1.1. SISSEJUHATUS

Kemikaalid võivad pääseda madalasse või sügavasse pinnavette näiteks otse annustatuna, õhku pihustatuna, äravoolu või kuivendamise kaudu, jäätmete kõrvaldamisel, tööstusliku, kodumajapidamise või põllumajandusliku heitveena ja atmosfäärist väljasadenemisel. Käesolev katsemeetod kirjeldab laborimeetodit, mida kasutatakse orgaaniliste kemikaalide aeroobse ja anaeroobse transformatsiooni hindamiseks põhjasettes. See põhineb olemasolevatel juhenditel (1, 2, 3, 4, 5, 6). Käesolevas katses kasutatavate pinnaste arvu ja tüüpide osas lepiti kokku pinnase ja sedimentide valikut käsitlevas OECD töörühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (7). Töörühm tegi samuti soovitusi seoses mullaproovide kogumise, käsitlemise ja säilitamisega, vastavalt ISO juhendile (8). Sellised uuringud tehakse kemikaalidega, mida levitatakse otse vette või mis tõenäoliselt jõuavad veekeskkonda eespool kirjeldatud viisil.

Loodusliku põhjasette tingimused on tihti aeroobsed ülemises veefaasis. Sette pinnakiht võib olla kas aeroobne või anaeroobne, kuigi sügavam sete on tavaliselt anaeroobne. Kõikide nende võimaluste hõlmamiseks kirjeldatakse käesolevas dokumendis nii aeroobseid kui ka anaeroobseid katseid. Aeroobne katse simuleerib aeroobset veesammast, mille all on aeroobne settekiht ja mille all omakorda anaeroobne gradient. Anaeroobne katse simuleerib täielikult anaeroobset põhjasetet. Kui asjaolud viitavad sellele, et on vaja oluliselt kõrvale kalduda neist soovitustest, nt kasutades puutumata sette tuuma või setteid, mis võivad olla kokku puutunud katseainetega, on selleks kättesaadavad muud meetodid (9).

1.2. MÕISTED

SI-ühikuid tuleks kasutada igal juhul.

Katseaine – mis tahes aine, kas lähteühend või vastav transformatsioonisaadus.

Transformatsioonisaadused – kõik katseaine biootilistes või abiootilistes transformatsioonireaktsioonides saadud ained, kaasa arvatud CO_2 ja tooted, mis on seotud jääkides.

Seotud jäägid – pinnases, taimedes või loomades olevad ühendid, mis ekstraheerimise järel säilivad matriitsis lähteainena või selle metaboliidi(metaboliitide)/transformatsioonisaadustena. Ekstraheerimismeetod ei tohiks oluliselt muuta ühendit ennast või matriitsi struktuuri. Seose olemust saab selgitada osaliselt matriitsi muutva ekstraheerimismeetodi ja täiustatud analüüsitehnikate abil. Tänaseni, näiteks, on sel viisil kindlaks tehtud kovalentsed ioonsidemed ja sorptsioonsidemed ning „lõksud”. Üldiselt vähendab seotud jääkide teke oluliselt bioloogilist kättesaadavust ja bioloogilist omastatavust (10) (1984. aasta IUPACi muudatus (11)).

▼B

Aeroobne transformatsioon – (oksüdeeriv): reaktsioonid, milles osaleb molekulaarne hapnik (12).

Anaeroobne transformatsioon – (redutseeriv): reaktsioonid, milles ei osale molekulaarne hapnik (12).

Looduslikud veed – pinnaveed, mis on saadud tiikides, jõgedes, ojadest jm.

Sete – segu mineraalsetest ja orgaanilistest keemilistest koostisainetest, millest viimased sisaldavad kõrge süsiniku- ja lämmastikusisaldusega ning suure molekulmassiga ühendeid. See sadestub looduslikku vette, millega ta moodustab piirkihi.

Mineralisatsioon – orgaanilise ühendi täielik lagunemine CO_2-ks ja H_2O-ks aeroobsetes tingimustes ning CH_4-ks, CO_2-ks ja H_2O-ks anaeroobsetes tingimustes. Käesoleva katsemeetodi kontekstis, kui kasutatakse radiomärgistatud ühendit, tähendab mineralisatsioon ulatuslikku lagundamist, mille käigus märgistatud süsinikuaatom oksüdeeritakse ning vabaneb sobiv kogus $^{14}CO_2$ või $^{14}CH_4$.

Poolestusaeg, $t_{0,5}$ – aeg, mis kulub katseaine 50 %liseks transformatsiooniks, kui transformatsiooni saab kirjeldada esimese astme kineetika abil; poolestusaeg ei sõltu lähtekontsentratsioonist.

DT_{50} (hävimisaeg 50) – aeg, mille jooksul katseaine lähtekontsentratsiooni vähendatakse 50 % võrra.

DT_{75} (hävimisaeg 75) – aeg, mille jooksul katseaine lähtekontsentratsiooni vähendatakse 75 % võrra.

DT_{90} (hävimisaeg 90) – aeg, mille jooksul katseaine lähtekontsentratsiooni vähendatakse 90 % võrra.

1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusaineid tuleks kasutada transformatsioonisaaduste identifitseerimiseks ja/või kvantifitseerimiseks spektroskoopiliste ja kromatograafiliste meetodite abil.

1.4. TEAVE KATSEAINE KOHTA

Märgistamata või isotoopmärgistatud katseainet saab kasutada transformatsioonikiiruse mõõtmiseks, kuigi eelistatakse märgistatud materjali. Märgistatud materjal on nõutav transformatsioonitee uurimiseks ja ainetaseme määramiseks. ^{14}C-märgistust soovitatakse, kuid muude isotoopide (näiteks ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P) kasutamine võib olla samuti kasulik. Niipalju kui võimalik tuleks märgistus asetada molekuli kõige stabiilsema(te) osa(de) külge ([1]). Katseaine keemiline ja/või radiokeemiline puhtus peaks olema vähemalt 95 %.

Enne katse sooritamist peaks katseaine kohta olemas olema järgmine teave:

a) lahustuvus vees (meetod A.6);

b) lahustuvus orgaanilistes lahustites;

c) aururõhk (meetod A.4) ja Henry konstant;

([1]) Näiteks, kui aine sisaldab ühte rõngast, tuleb see rõngas märgistada. Kui katseaine sisaldab kahte või enamat rõngast, on vaja eraldi katseid teha, et hinnata iga märgistatud rõnga säilimise hindamiseks ning sobiva teabe saamiseks transformatsioonisaaduste tekke kohta.

▼B

d) n-oktanooli/vee jaotustegur (meetod A.8);

e) adsorptsioonikoefitsient (K_d, K_f või K_{oc} vajaduse korral) (meetod C.18);

f) hüdrolüüs (meetod C.7);

g) dissotsiatsioonikonstant (pK_a) (OECD juhend 112) (13);

h) katseaine keemiline struktuur ja isotoopmärgistus(t)e asukoht, kui need esinevad.

Märkus. Tuleks märkida temperatuur, mille juures mõõtmisi tehakse.

Muu kasuliku teabe hulka võivad kuuluda andmed katseaine mikroorganismidele mõjuva mürgisuse kohta, andmed kiire ja/või inherentse biolagundatavuse kohta ning andmed aeroobse ja anaeroobse transformatsiooni kohta pinnases.

Katseaine ja selle vees ja settes olevate transformatsioonisaaduste kvantifitseerimise ja identifitseerimise analüüsimeetodid (sh ekstraheerimis- ja puhastamismeetodid) peaksid olema kättesaadavad (vt punkti 1.7.2).

1.5. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Käesolevas katses kirjeldatud meetod kasutab aeroobseid ja anaeroobseid põhjasetteid (vt 1. liidet), mis võimaldavad:

i) katseaine transformatsioonikiiruse mõõtmist põhjasettes;

ii) katseaine transformatsioonikiiruse mõõtmist settes;

iii) katseaine ja/või transformatsioonisaaduste mineralisatsioonikiiruse mõõtmist (kui kasutatakse ^{14}C-märgistusega katseainet);

iv) transformatsioonisaaduste identifitseerimine ja kvantifitseerimine vee- ja settefaasides, sh ainetase (kui kasutatakse märgistatud katseainet);

v) katseaine ja selle transformatsioonisaaduste jaotamise mõõtmine kahe faasi vahel inkubatsiooni ajal pimedas (et vältida, näiteks, vetikavohangut) konstantsel temperatuuril. Poolestusajad, DT_{50}, DT_{75} ja DT_{90} väärtused määratakse, kui andmed seda lubavad, kuid neid ei tohiks ekstrapoleerida pikalt üle katseperioodi (vt punkti 1.2).

Vähemalt kaks setet ja nendega seotud veed on nõutavad nii aeroobseks kui anaeroobseks katseks (7). Siiski võib esineda olukordi, kui tuleks kasutada rohkem kui kahte põhjasetet, näiteks, kemikaalide puhul, mis võivad esineda magevees ja/või merekeskkonnas.

▼B

1.6. KATSE KOHALDAMISALA

Meetodit kohaldatakse kõikide keemiliste ainete suhtes (märgistamata või märgistatud, mille kohta on olemas piisavalt täpne ja tundlik analüüsimeetod. See on kohaldatav kergelt lenduvate, mittelenduvate, veeslahustuvate või vees halvasti lahustuvate ühendite suhtes. Katset ei kohaldata kemikaalide suhtes, mis kergesti lenduvad pinnasest (nt fumigandid, orgaanilised lahustid) ja seega ei saa seda hoida vees ja/või settes käesolevates katsemeetodites.

Meetodit on kohaldatud nii palju, et uurida kemikaalide transformatsiooni magevees ja setetes, kuid põhimõtteliselt võib seda kohaldada ka suudmealas ja merekeskkonnas. See ei sobi voolava vee (nt jõed) või avamere tingimuste simuleerimiseks.

1.7. KVALITEEDIKRITEERIUMID

1.7.1. **Saagis**

Vähemalt kahe vee- ja setteproovi ekstraheerimine ja analüüs kohe katseaine lisamise järel annab esimesi märke analüüsimeetodi korratavuse kohta ning katseaine manustamise ühtsuse kohta Saagised katse hilisematelt etappidelt on saadud vastavatelt ainetasemetelt (kui kasutatakse märgistatud materjali). Saagised peaksid jääma vahemikku 90–110 % märgistatud kemikaalide puhul (6) ja 70–110 % märgistamata kemikaalide puhul.

1.7.2. **Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus**

Analüüsimeetodi korratavust (v.a alguses tehtud ekstraheerimise tõhusus) katseaine ja transformatsiooni saaduste kvantifitseerimiseks saab kontrollida, korduvanalüüsides samast veest või settest tehtud ekstrakti, mida on inkubeeritud seni, kuni tekivad transformatsioonisaadused.

Katseaine ja transformatsioonisaaduste puhul peaks analüüsimeetodi avastamislävi (LOD) olema vähemalt 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ vee- või setteproovina (katseainena) või 1 % kasutatud lähteannusest, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kvantifikatsioonilävi (LOQ) tuleks samuti määrata.

1.7.3. **Transformatsioonist saadud andmete täpsus**

Katseaine kontsentratsioonide regressioonanalüüs ajafunktsioonina annab vajalikku teavet transformatsioonikõvera täpsuse kohta ning võimaldab arvutada poolestusaegade usalduspiire (näilise esimese astme kineetika puhul) või DT_{50} väärtused ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} väärtused.

1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.8.1. **Katsesüsteem ja -seadmed**

Katse tuleks teha klaasmahutites (nt pudelid, tsentrifuugiküvetid), välja arvatud juhul, kui esialgne teave (nt (n-oktanooli-vee jaotustegur, sorbtsiooniandmed jne) viitab sellele, et katseaine võib kinnituda klaasile, mistõttu võiks kaaluda alternatiivse materjali kasutamist (nt Teflon®). Kui on teada, et katseaine kinnitub klaasile, võib olla võimalik leevendada seda probleemi, kasutades ühte või mitut järgmistest meetoditest:

▼B

— määrata klaasile kinnitunud katseaine ja transformatsioonisaaduste mass;

— pesta kõik klaasnõud lahustiga katse lõpus;

— kasutada preparaate (vt ka punkti 1.9.2);

— kasutada katseaine süsteemi lisamisel kaaslahusti suurenenud kogust; kui kasutatakse kaaslahustit, peaks see olema selline, mis ei solvolüüsi katseainet.

Tüüpilise katseseadme näited, s.t gaasimöödavoolu- ja biomeetersüsteemid, on toodud vastavalt 2. ja 3. liites (14). Muid kasulikke inkubatsioonisüsteeme on kirjeldatud viites 15. Katseseadme ülesehitus peaks olema selline, et see võimaldab õhu või lämmastiku vahetust ning lenduvate ainete püüdmist. Seadme mõõdud peaksid vastama katsetingimustele (vt 1.9.1). Ventilatsioon tagatakse kas kerge mullitamise või viies õhu või lämmastiku veepinnale. Viimasel juhul on soovitav segada vett kergelt ülevalpool, et hapnik või lämmastik vees paremini leviks. CO_2-vaba õhku ei tohiks kasutada, kuna see võib põhjustada vee pH taseme tõusu. Igal juhul sette häirimine on ebasoovitav ja seda peaks vältima niipalju kui võimalik. Kergelt lenduvaid aineid tuleks uurida biomeetersüsteemis, veepinda kergelt segades. Samuti võib kasutada suletud anumaid, milles on kas atmosfääriõhuga või lämmastikuga õhuruum, ja sisemisi pudeleid lenduvate ainete püüdmiseks (16). Õhuruumi gaasi regulaarne vahetumine on nõutav aeroobses katses, et kompenseerida hapniku tarbimist biomassi poolt.

Lenduvate transformatsioonisaaduste kogumiseks sobivad lõksud sisaldavad, kuid mitte ainult 1 mol· dm^{-3} kaaliumhüdroksiidi või naatriumhüdroksiidi lahuseid süsinikdioksiidi puhul ([1]) ja etüleenglükooli, etanoolamiini või 2 % parafiini ksüleenis orgaaniliste ühendite puhul. Anaeroobsetes tingimustes tekkinud lenduvad ained, näiteks metaan, saab koguda, näiteks, molekulaarsõelade abil. Sellised lenduvad ained saab põletada, näiteks, CO_2-ks, viies gaasi CuO-ga täidetud kvartstorusse temperatuuril 900 °C ja püüdes absorberis tekkinud CO_2 leelisesse (17).

Nõutavad on katseainete ja transformatsioonisaaduste keemilise analüüsi laboriseadmed (nt gaasvedelikkromatograafia (GLC), kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC), planaarkromatograafia (TLC), mass-spektroskoopia (MS), gaaskromatograaifa – mass-spektroskoopia (GS-MS), vedelikkromatograafia – mass-spektromeetria (LC-MS), tuumamagnetresonants (NMR) jne), sh vajaduse korral radiomärgistatud või märgistamata kemikaalide avastamissüsteemid. Kui kasutatakse radiomärgistatud materjali, soovitatakse samuti vedelikstsintsillatsioonloendurit ja oksüdeerijat põletamiseks (setteproovide põletamiseks enne radioaktiivsuse analüüsi).

Muud standardlaboriseadmed füüsikalis-keemiliste ja bioloogiliste määramiste joaks (vt tabelit 1 punktis 1.8.2.2), klaasnõud, kemikaalid ja reaktiivid on nõutavad vastavalt vajadusele.

([1]) Kuna nimetatud leeliselised absorbtsioonilahused absorbeerivad ka õhutamisel süsinikdioksiidi ning aeroobsetes katsetes hingamisel tekkinud süsinikdioksiidi, tuleb neid regulaarselt vahetada, et vältida nende küllastumist ja seega nende absorbtsioonivõime hävimist.

▼B

1.8.2. **Põhjasetete valik ja arv**

Proovivõtukohad tuleks valida vastavalt katse eesmärgile igas nimetatud olukorras. Proovivõtukohtade valikul tuleks kaaluda valgla ja vee ülesvoolu võimalikke põllumajanduslikke, tööstuslikke või kodumajapidamise sisendeid. Setteid ei tohiks kasutada, kui need on saastatud katseainega või selle struktuurse analoogiga viimase 4 aasta jooksul.

1.8.2.1. *Sette valik*

Tavaliselt kasutatakse aeroobsetes katsetes kahte setet (7). Need kaks setet peaksid erinema orgaanilise süsiniku sisalduse ja tekstuuri poolest. Ühel settel on kõrge orgaanilise süsiniku sisaldus (2,5–7,5 %) ja peen tekstuur, teisel on madal orgaanilise aine sisaldus (0,5–2,5 %) ja jäme tekstuur. Orgaanilise süsiniku sisaldused peaksid tavaliselt erinema vähemalt 2 %. „Peen tekstuur" tähendab määratluse järgi > 50 % [savi + aleuriidi] ([1]) sisaldust ja „jäme tekstuur" < 50 % [savi + aleuriidi] sisaldust. Kahe sette [savi + aleuriidi] sisaldus peaks tavaliselt erinema vähemalt 20 %. Juhul, kui kemikaal võib samuti jõuda merevette, peaks vähemalt üks põhjasete olema pärit merest.

Rangelt anaeroobses katses tuleks valida prooviks kaks setet (sh nendega seotud vesi) pinnaveemassist anaeroobselt alalt (7). Sette- ja veefaase tuleks käsitleda ja transportida ettevaatlikult hapnikuta tingimustes.

Muud parameetrid võivad olla tähtsad setete valikul ja neid tuleks arvesse võtta iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Näiteks, setete pH-vahemik on tähtis selliste kemikaalide uurimisel, mille transformatsioon ja/või sorbtsioon sõltub pH-st. Sorbtsiooni pH-sõltuvust saab peegeldada katseaine pK_a väärtuses.

1.8.2.2. *Põhjasette proovide kirjeldamine*

Nii vee kui sette puhul peamised parameetrid, mida tuleb mõõta ja millest tuleb teatada (viidates katsemeetodile), ning katseetapp, milles need parameetrid määratakse, on esitatud kokkuvõtlikult siin toodud tabelis. Nende parameetrite määramismeetodid on toodud viidetes (18, 19, 20, 21).

Lisaks sellele võib osutuda vajalikuks mõõta ja teatada ka muudest parameetritest iga juhtumi puhul eraldi (nt magevee puhul: osakesed, aluselisus, kõvadus, elektrijuhtivus, NO_3/PO_4 (suhe ja üksikud väärtused); setete puhul: katioonvahetusvõime, veemahutavus, karbonaat, kogulämmastik ja -fosfor, ning merede puhul: soolsus). Setete või vee analüüs nitraadi, sulfaadi, biokättesaadava raua ja muude võimalike elektronaktseptorite kohta võib olla kasulik redokstingimuste hindamisel, eriti seoses anaeroobse transformatsiooniga.

([1]) [Savi + aleuriit] on sette mineraalfraktsioon, mille osakeste suurus on < 50 μm.

▼B

Vee-setteproovide iseloomustamiseks kasutatavate parameetrite mõõtmine (7, 22, 23)

Parameeter	Katseprotseduuri etapp					
	väliproovide võtmine	järelkäsitlemine	kohanemise algus	katse algus	katse käigus	katse lõpp
Vesi						
Päritolu/allikas	X					
Temperatuur (^{o}C)	X					
pH	X		X	X	X	X
Kogu orgaaniline süsinik			X	X		X
O_2 kontsentratsioon (*)	X		X	X	X	X
Redokspotentsiaal (*)			X	X	X	X
Setted						
Päritolu/allikas	X					
Kihi sügavus	X					
pH		X	X	X	X	X
Osakeste jaotus		X				
Kogu orgaaniline siisinik		X	X	X		X
Mikroobi biomass (*)		X		X		X
Redokspotentsiaal (**)	Vaatlused (värv/lõhn)		X	X	X	X

(*) Aeroobsetes uuringutes mikroobide hingamiskiiruse meetod (26), suitsutusmeetod (27) või bakterite arvu määramine (nt bakterid, kiirikbakterid, seened ja kolooniate koguarv), anaeroobsetes uuringutes metanogeneesi kiirus.

(**) Viimased uurimustulemused on näidanud, et vee hapniku kontsentratsioonide ja redokspotentsiaalide mõõtmistel ei ole mehhanistlikku ega ennustatavat väärtust, kui käsitletakse mikroobipopulatsioonide kasvu ja arengut pinnavetes (24, 25). Biokeemilise hapnikutarbe (BOD – määramine väliproovide võtmisel, katse alguses või lõpus) ja mikro-/makrotoitainete Ca, Mg ja Mn kontsentratsioonide määramine (katse alguses ja lõpus) vees ning kogulämmastiku ja kogukaaliumi mõõtmine setetes (väliproovide võtmise ajal ja katse lõpus) sobivad paremini aeroobse biotransformatsiooni kiiruste ja teede tõlgendamiseks ja hindamiseks.

1.8.3. **Kogumine, käsitlemine ja säilitamine**

1.8.3.1. *Kogumine*

ISO põhjasetteproovide võtmist käsitleva juhendi (8) eelnõud tuleks kasutada setteproovide võtmisel. Setteproovid tuleks võtta sette 5–10 cm ülemisest kihist. Settega seotud vesi tuleks koguda samast kohast ja samal ajal kui sete. Anaeroobse katse puhul tuleks sette- ja sellega seotud vee proove võtta ja transportida hapnikuta (28) (vt punkti 1.8.2.1). Mõningaid proovivõtuseadmeid on kirjeldatud kirjanduses (8, 23).

▼B

1.8.3.2. *Käsitlemine*

Sete eraldatakse veest filtreerimise teel ja sete märgsõelutakse läbi 2 mm sõelaava, kasutades liigsed proovivõtukohast võetud vett, mis seejärel visatakse minema. Seejärel segatakse soovitud suhtes (vt punkti 1.9.1) sette ja vee teadaolevad kogused inkubatsioonikolbides ja valmistataks ette kohanemiseks (vt punkti 1.8.4). Anaeroobse katse puhul tuleb sooritada kõik käsitlemisetapid hapniku puudumisel (29, 30, 31, 32, 33).

1.8.3.3. *Säilitamine*

Värskelt võetud sette- ja veeproovide kasutamist soovitatakse väga, kuid kuna säilitamine on vajalik, tuleks sete ja vesi sõeluda selliselt, nagu on kirjeldatud eespool, ja säilitada koos, veega küllastatult (6–10 cm veekiht), pimedas, temperatuuril 4 ± 2 °C ([1]) maksimaalselt 4 nädalat (7, 8, 23). Aeroobsetes katsetes kasutatud proovid tuleks säilitada vaba õhu juurdepääsuga (nt avatud mahutites), samas anaeroobsete katsete proovid tuleks säilitada ilma hapnikuta. Transportimisel ja säilitamisel ei tohi sette- või veeproove külmutada või setteproove kuivatada.

1.8.4. **Sette-/veeproovide katseks ettevalmistamine**

Kohanemisperiood peaks aset leidma enne katseaine lisamist, asetades iga sette-/veeproovi inkubatsiooninõusse, mida kasutatakse põhikatses, ja kohanemine toimub täpselt samades tingimustes nagu katseinkubatsioon (vt punkti 1.9.1). Kohanemisperiood on aeg, mis kulub süsteemi mõistliku stabiilsuse saavutamiseks, mida peegeldavad pH, hapniku kontsentratsioon vees, sette- ja veeproovi redokspotentsiaal ning faaside makroskoopiline eraldamine. Kohanemisperiood peaks tavaliselt kestma üks kuni kaks nädalat ja ei tohiks ületada nelja nädalat. Nimetatud perioodil tehtud määramiste tulemused tuleks teha teatavaks.

1.9. KATSE KÄIK

1.9.1. **Katsetingimused**

Katse tehakse inkubatsiooniseadmes (vt punkti 1.8.1), milles vee ja sette mahusuhe on 3:1 ja 4:1 ning settekiht on 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Vähemalt 50 g setet (kuivmass) inkubatsioonianuma kohta on soovitav.

Katse tuleks sooritada pimedas konstantsel temperatuuril vahemikus 10–30 °C. Temperatuur (20 ± 2) °C on sobiv. Vajaduse korral võib kasutada täiendavaid madalamaid temperatuure (nt 10 °C) iga juhtumi puhul eraldi, sõltuvalt katse kohta nõutavast teabest. Inkubatsioonitemperatuuri tuleks jälgida ja sellest teatada.

([1]) Viimased uuringud on näidanud, et säilitamine temperatuuril 4 °C võib põhjustada sette orgaanilise süsiniku sisalduse vähenemist, mille võimalikuks tulemuseks on mikroobide tegevuse vähenemine (34).

▼B

1.9.2. **Katseaine töötlemine ja lisamine**

Kasutatakse kemikaali ühte katsekontsentratsiooni ([1]). Põllukultuuride kemikaalide puhul, mida lisatakse otse veemassi, tuleks tõlgendada suurima annusena märgistusel suurimat lisamiskiirust, mis on arvutatud katseanuma vee pindala põhjal. Kõikidel muudel juhtudel peaks kasutatav kontsentratsioon põhinema keskkonnaemissioonidest tehtud ennustuste põhjal. Tuleks püüda tagada seda, et katseainet lisatakse piisavas kontsentratsioonis selleks, et iseloomustada transformatsiooniteed ning transformatsioonisaaduste teke ja vähenemist. Võib osutuda vajalikuks lisada suuremaid annuseid (nt 10kordsed) olukordades, kus katseaine kontsentratsioonid on lähedal avastamispiiridele katse alguses ja/või kui peamisi transformatsioonisaaduseid ei suudeta kohe avastada, kuna nende kontsentratsioon on 10 % katseaine annusemäärast. Kui kasutatakse suuremaid kontsentratsioone, ei tohiks neil olla olulist negatiivset mõju vee-settesüsteemi mikroobide tegevusele. Katseaine konstantse kontsentratsiooni saamiseks erinevate mõõtmetega anumates võib pidada vajalikuks lisatava aine koguse kohandamist, mis põhineb veesamba sügavusel anumas seoses vee sügavusega uuritavas keskkonnas (mis eeldatavasti on 100 cm, kuid võib kasutada ka muid sügavusi). Vt 4. lisa näidisarvutamise kohta.

Ideaaljuhul tuleks lisada katseainet vesilahusena katsesüsteemi veefaasi. Kui see on vältimatu, on lubatud kasutada veega segunevate lahustite (nt atsetoon, etanool) väikeseid koguseid katseaine lisamiseks ja jaotamiseks, kuid see ei tohiks ületada 1 % v/v ja sellel ei tohiks olla kahjulikke mõjusid katsesüsteemi mikroobide tegevusele. Katseaine vesilahus tuleks teha hoolikalt – täieliku homogeensuse tagamiseks võib vaja minna generaatorkolonne ja eelsegamist. Katsesüsteemi vesilahuse lisamise järel on soovitav veefaasi õrnalt segada, häirides setet nii vähe kui võimalik.

Preparaatide kasutamist tavaliselt ei soovitata, kuna preparaatide koostisosad võivad mõjutada katseaine ja/või transformatsioonisaaduste jaotumist vee- ja settefaaside vahel. Nt nõrgalt veeslahustuva katseaine puhul võib siiski kasutada preparaati sobiva alternatiivina.

Inkubatsioonianumate arv sõltub proovivõtukordade arvust (vt punkti 1.9.3). Katsesüsteeme peaks olema piisavalt, et igal proovivõtukorral võib kasutada kahte süsteemi. Kui iga põhjasettesüsteemi kohta tehakse kontrollproovid, ei tohiks neid töödelda katseainega. Kontrollproove saab kasutada sette mikroobi biomassi ning vee- ja setteproovide orgaanilise süsiniku koguarvu määramiseks katse lõpus. Kahte kontrollproovi (s.t üks kontrollproov iga põhjasette kohta) saab kasutada nõutud parameetrite jälgimiseks settes ja vees kohanemise ajal (vt tabelit punktis 1.8.2.2). Tuleks teha kaks täiendavat kontrollproovi juhul, kui katseainet lisatakse lahusti abil, et mõõta kahjulikke mõjusid katsesüsteemi mikroobide tegevusele.

([1]) Katse tegemine teise kontsentratsiooniga võib olla kasulik kemikaalide puhul, mis jõuavad pinnavette erinevaid teid pidi oluliselt erinevate kontsentratsioonide tõttu, kuni saab analüüsida väiksemat kontsentratsiooni piisavalt täpselt.

▼B

1.9.3. **Katse kestus ja proovide võtmine**

Katse ei tohiks tavaliselt kesta kauem kui 100 päeva (6) ning peaks jätkuma seni, kuni lagunemise ja vee/sette jaotamise kohta esitatakse selgitus või kui 90 % katseainest on hävinud transformatsiooni ja/või lendumise tõttu. Proovivõtukordade arv peaks olema vähemalt kuus (sealhulgas proovivõtu 0 kord), ja enne katset võib kasutada valikulist eelkatset (vt punkti 1.9.4), mille käigus määratakse asjaomased proovivõturežiimid ja katse kestus, välja arvatud juhul, kui katseaine kohta on olemas piisavalt andmeid eelnevatest uuringutest. Hüdrofoobsete katseainete puhul võib vaja minna täiendavaid proovivõtuhetki katse algperioodil, et määrata vee- ja settefaaside jaotamise kiirus.

Asjaomastel proovivõtuaegadel eemaldatakse analüüsis kõik inkubatsioonianumad (paralleelproovides). Setet ja selle peal olevat vett analüüsitakse eraldi ([1]). Pinnavesi tuleks hoolikalt eemaldada setet minimaalselt häirides. Katseaine ja transformatsioonisaaduste ekstraheerimine ja karakteriseerimine peaksid järgima asjaomaseid analüütilisi protseduure. Tuleks hoolikalt eemaldada aine, mis võib olla adsorbeerunud inkubatsioonianumasse või lenduvate ainete püüdmistorusse.

1.9.4. **Valikulised eelkatsed**

Kui proovivõtu kestust ja režiimi ei saa hinnata muude, katseainet käsitlevate asjaomaste uuringute põhjal, võib pidada vajalikuks teha valikuline eelkatse, mis tuleks sooritada, kasutades samu katsetingimusi, mis on välja pakutud lõppuuringuks. Asjaomased katsetingimuste ja eelkatse tulemuste kohta, kui see on sooritatud) tuleks esitada lühiprotokoll.

1.9.5. **Mõõtmised ja analüüs**

Katseaine a transformatsioonisaaduste kontsentratsiooni igal proovivõtu korral vees ja settes tuleks mõõta ja neist teatada (lisatud kontsentratsiooni ja protsendimäärana). Üldiselt tuleks identifitseerida transformatsoonisaadused, mis on avastatud $\geq$ 10 %na radioaktiivsest ainest vee-sette koguproovis igal proovivõtuajal, kui seda ei ole mõistlikult teisiti põhjendatud. Transformatsioonisaaduseid, mille kontsentratsioonid katse käigus pidevalt kasvavad, tuleks samuti identifitseerimisel arvesse võtta, isegi siis, kui nende kontsentratsioonid ei ületa eespool toodud piirnorme, kuna see võib viidata aine püsivusele. Viimast tuleks arvesse võtta iga juhtumi puhul eraldi, tuues põhjendused protokollis.

Gaaside/lenduvate ainete püüdmissüsteemide (CO_2 ja muud, s.t. lenduvad orgaanilised ühendid) tulemustest tuleks teatada igal proovivõtuajal. Tuleks teatada ka mineralisatsioonikiirus. Ekstraheerimata (seotud) jääkidest settes tuleks teatada igal proovivõtuhetkel.

([1]) Kui võib toimuda kiire anaeroobsete transformatsioonisaaduste reoksüdeerumine, tuleks säilitada anaeroobsed tingimused proovivõtu ja analüüsimise ajal.

▼B

2. **TULEMUSED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Lisatud radioaktiivse aine kogu ainetase või saagis (vt punkti 1.7.1) arvutatakse igal proovivõtukorral. Tulemustest tuleks teada anda lisatud radioaktiivse aine protsendimäärana. Radioaktiivse aine jaotamisest vee ja sette vahel tuleks teatada kontsentratsioonide ja protsendimääradena igal proovivõtukorral.

Katseaine poolestusaeg, DT_{50} ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} tuleks arvutada koos usalduspiiridega (vt punkti 1.7.3). Teavet katseaine hävimiskiiruse kohta vees ja settes võib saada sobivate hindamisprotseduuride abil. Nende hulka kuuluvad näiline esimese astme kineetika, graafilisi või numbrilisi lahendeid kasutavad empiirilised kõvera moodustamise tehnika ning keerukamad hindamised, näiteks ühe või mitme lahtriga näidised. Täiendavaid üksikasju võib leida asjaomasest avaldatud kirjandusest (35, 36, 37).

Kõikidel lähenemistel on oma tugevad ja nõrgad küljed ning need erinevad märkimisväärselt oma keerukuse poolest. Esimese astme kineetika võib lagundamis- ja jaotamisprotsesse liiga lihtsustada, kuid võimaluse korral lisab suuruse (kiirusekonstant või poolestusaeg), mis on hõlpsasti mõistetav ja mis on väärtuslik simulatsioonimudelite koostamisel ja prognoositavate arvutuskontsentratsioonide arvutamisel. Empiiriliste lähenemiste või lineaarsete transformatsioonide käigus võidakse saada andmete jaoks paremini sobivaid kõveraid ja seetõttu hinnata paremini poolestusaegasid, DT_{50} ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} väärtusi. Tuletatud konstantide kasutamine on siiski piiratud. Lahternäidiste abil võib luua riski hindamise jaoks kasulikke, väärtuslikke konstante, mis kirjeldavad lagunemiskiirust erinevates sektorites ja kemikaali jaotust. Neid tuleks samuti kasutada kiiruskonstantide hindamiseks peamiste transformatsioonisaaduse tekkel ja lagunemisel. Kõikidel juhtudel tuleb valitud meetodit põhjendada ja eksperimenteerija peaks graafiliselt ja/või statistiliselt esitama sobivuse headuse.

3. **PROTOKOLL**

3.1. KATSEPROTOKOLL

Protokoll peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

— üldnimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (tuues ära märgi/märkide asukoha, kui kasutatakse radiomärgistatud ainet) ja asjaomased füüsikalis-keemilised omadused;

— katseaine puhtus (lisandid);

— märgistatud kemikaali radiokeemiline puhtus ja molaarne aktiivsus (vajaduse korral).

▼B

Võrdlusained:

— selliste võrdlusainete keemiline nimetus ja struktuur, mida kasutatakse transformatsioonisaaduste kirjeldamiseks ja/või identifitseerimiseks.

Uuritavad setted ja veed:

— põhjasettest proovide võtmise koha (kohtade) asukoht ja kirjeldus, sh võimaluse korral saastumise ajalugu;

— kogu teave vee-settesüsteemide kogumise, säilitamise (kui säilitatakse) ja kohanemise kohta;

— vee-setteproovide tunnused, mis on loetletud punkti 1.8.2.2 tabelis.

Katsetingimused:

— kasutatud katsesüsteem (nt möödavool, biomeeter, õhutamisviis, segamismeetod, veemaht, settemass, nii vee- kui ka settekihi paksus, katseanumate mõõdud jne);

— katseaine lisamine katsesüsteemi: kasutatud katsekontsentratsioon, paralleelproovide ja kontrollproovide arv, katseaine lisamisviis (nt lahusti abil, kui seda kasutatakse) jne;

— inkubatsioonitemperatuur;

— proovivõtuajad;

— ekstraheerimismeetodid ja -tõhusused ning analüüsimeetodid ja avastamispiirid;

— transformatsioonisaaduste kirjeldamise/identifitseerimise meetodid;

— kõrvalekalded katseprotokollist või katsetingimustest katse käigus.

Tulemused:

— representatiivsete analüüside töötlemata andmed (kõik töötlemata andmed tuleb säilitada labori arhiivis);

— kasutatud analüüsimeetodite korratavus ja tundlikkus;

— saagisemäärad (valiidse katse protsendimäärad on toodud punktis 1.7.1);

— tulemused tabeli kujul, väljendatuna katseaine ja vajaduse korral transformatsioonisaaduste ning ekstraheerimata radioaktiivsete ainete protsendimäärana lähteannusest ja vajaduse korral mg· kg^{-1} vees, settes ja kogu süsteemis (vaid protsendina);

— ainetase uuringute kestel ja lõpus;

— vee- ja settefraktsioonides ning kogu süsteemis toimunud transformatsiooni (sh mineralisatsiooni) graafiline esitamine;

— mineralisatsioonikiirused;

▼B

— katseaine ja vajaduse korral peamiste transformatsioonisaaduste poolestusaeg, DT_{50} ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} väärtused, kaasa arvatud usalduspiirid vees, settes ja kogu süsteemis;

— hinnang katseaine ja vajaduse korral peamiste transformatsioonisaaduste transformatsioonikineetika kohta;

— vajaduse korral eeldatavad transformatsiooniteed;

— tulemuste arutelu.

4. **VIITED**

1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada, pp. 35–3 7.

5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

14) Scholz, K, Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.

▼B

15) Guth, JA. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631–637.

17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661–667.

18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17^{th} edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038–1039.

22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests', 3-4 July 1991.

23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.EA.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858–2868.

25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.EA.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329–338.

26) Anderson, T.H., Domsch, KH. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197–203.

27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13–21.

29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850–857.

30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U, Steber,]., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527–1550.

31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499–1509.

▼B

32) Nuck, BA. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597–3603.

33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961–968.

35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, 187–203.

36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, 47–60.

37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, pp. 1349–1354.

▼B

1. liide

JUHEND AEROOBSETE JA ANAEROOBSETE KATSESÜSTEEMIDE KOHTA

Aeroobne katsesüsteem

Käesolevas meetodis kirjeldatud aeroobne katsesüsteem sisaldab aeroobset veekihti (tüüpilised hapniku kontsentratsioonid on vahemikus 7–10 $mg \cdot l^{-1}$) ja settekihti, mis on aeroobne pinnal ja anaeroobne pinna all (tüüpilised keskmised redokspotentsiaalid (E_h) sette anaeroobsel alal on vahemikus – 80 kuni – 190 mV). Igas inkubatsiooniüksuses viiakse niisutatud õhk veepinnale piisava hapniku säilitamiseks õhuruumis.

Anaeroobne katsesüsteem

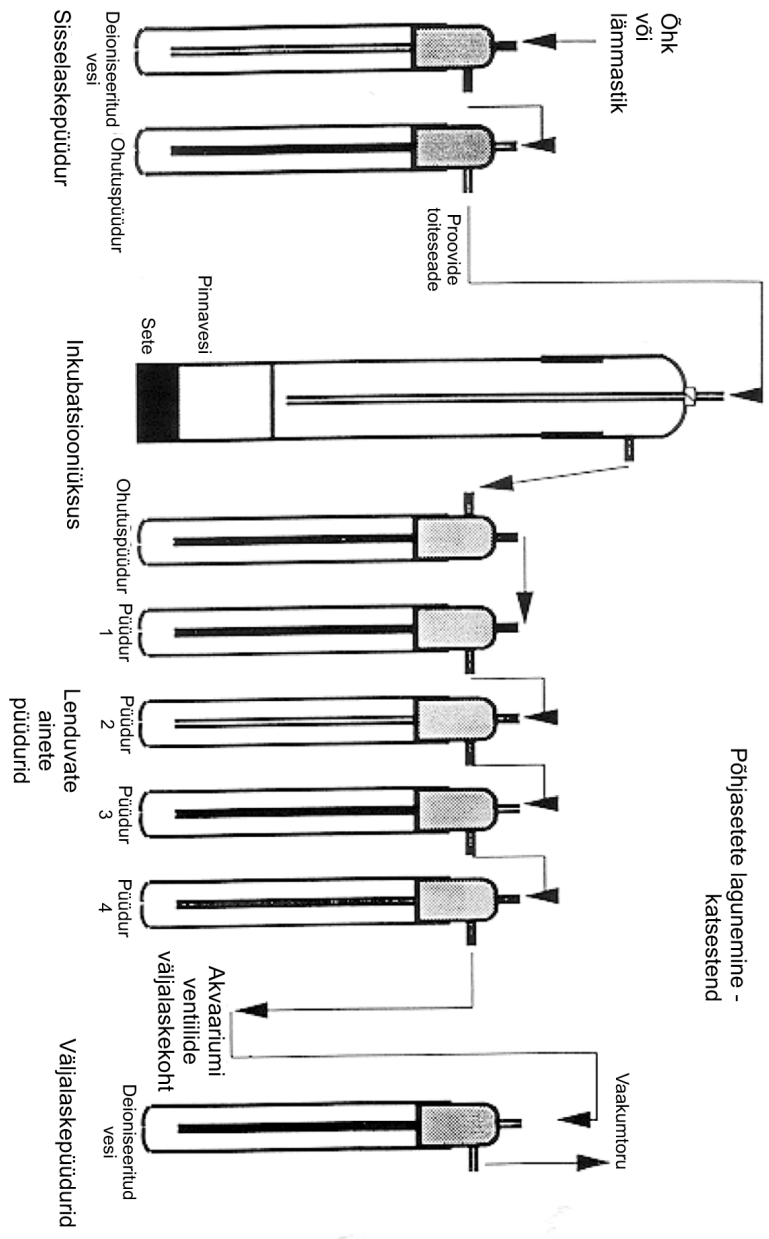
Anaeroobse katsesüsteemi puhul on katseprotseduur oma olemuselt samasugune kui aeroobses süsteemis, erandiks on see, et igas inkubatsiooniüksuses viiakse niisutatud lämmastik veepinnale lämmastiku õhuruumi säilitamiseks. Setet ja vett käsitletakse anaeroobsena, kui redokspotentsiaal (E_h) on madalam kui – 100 mV.

Anaeroobses katses sisaldab mineralisatsiooni hindamine tekkinud süsinikdioksiidi ja metaani mõõtmisi.

▼B

2. liide

GAASI MÖÖDAVOOLUSEADME NÄIDIS

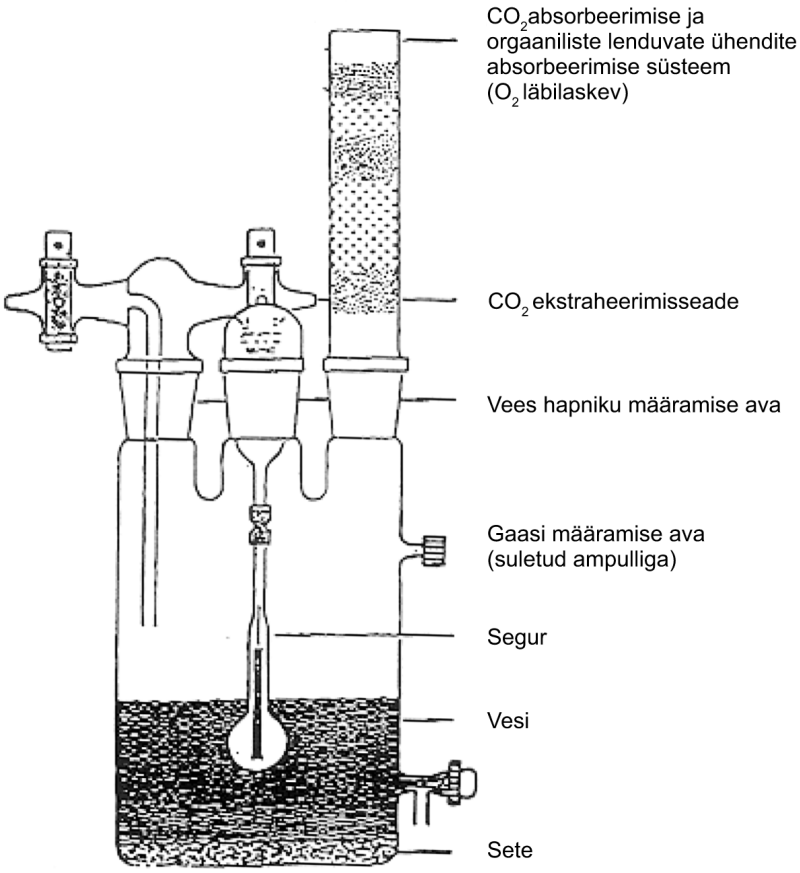


Ohutuspüüdur, tühi
Püüdur 1:
etüleenglükool lenduvate orgaaniliste ainete püüdmiseks
Püüdur 2:
väävelhape 0,1 M aluseliste lenduvate ainete püüdmiseks
Püüdurid 3 ja 4 %:
naatriumhüdroksiid 2M CO_2 ja muude happeliste lenduvate ainete püüdmiseks

▼B

3. liide

BIOMEETRI NÄIDIS



Magnetsegur

▼B

4. Liide

NÄIDISARVUTUS KATSEAINE ANNUSTAMISE KOHTA KATSEANUMATESSE

Silindri siseläbimõõt:	= 8 cm
Veesamba sügavus, v.a sete:	= 12 cm
Pindala: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Annusmäär: 500 g katseainet ha kohta vastab 5 µg/cm^2	
Kokku µg: 5 × 50,3	= 251,5 µg
Kohandada kogust seoses 100 cm sügavusega: 12 × 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Veesamba maht: 50,3 × 12	= 603 ml
Kontsentratsioon vees: 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/ml või 50 µg/l

▼M1

C.25. AEROOBNE MINERALISEERUMINE PINNAVEES – BIOLAGUNEMISE MUDELKATSE

1. METOODIKA

Käesolev metoodika on samaväärne standardiga OECD TG 309 (2004) (1).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva katse eesmärk on mõõta uuritava aine biolagunemise sõltuvust ajast aeroobses looduslikus vees madalatel kontsentratsioonidel ja väljendada mõõtmistulemused kineetiliste seoste vormis. Kõnesolev mudelkatse on laboratoorne loksutatavas kolvis läbiviidav portskatse, millega saab määrata orgaanilise aine aeroobse biolagunemise kiiruse loodusliku pinnavee (mage-, riim- või merevee) proovides. Metoodika põhineb standardil ISO/DIS 14592–1 (2), kuid sisaldab ka metoodikate C.23 ja C.24 elemente (3, 4). Uuritava mikrokosmi seisundi halvenemise vältimiseks võib pika katseaja korral asendada portsrežiimi poolpideva režiimiga, kuid see ei ole kohustuslik. Mudelkatse peamine eesmärk on määrata uuritava aine mineraliseerumine pinnavees ja esitada selle alusel lagunemise kineetika. Katse teine (mittekohustuslik) eesmärk võib olla teabe saamine esmase lagunemise ja oluliste muundumissaaduste kohta. Muundumissaaduste kindlakstegemine ja võimaluse korral nende sisalduse määramine on eriti oluline väga aeglaselt mineraliseeruvate ainete puhul (ained, mille ^{14}C-märgisega jäägi üldine poolestusaeg on üle 60 ööpäeva). Oluliste muundumissaaduste kindlakstegemiseks ja mõõtmiseks tuleb analüüsimeetodite piiratud võimaluste tõttu kasutada tavaliselt kõrgemaid uuritava aine kontsentratsioone (> 100 μg/l).

Kõnesoleva katse puhul tähendab madal kontsentratsioon uuritava aine sisaldust (1–100 μg/l), mis on nii madal, et katses saadud biolagunemise kineetika võiks kajastada eeldatavat kineetikat keskkonnas. Looduslikus katsevees leiduvate biolagundatavate süsiniksubstraatide üldmassiga võrreldes on madala kontsentratsiooniga uuritav aine sekundaarne substraat. Sellest järeldub, et biolagunemise kineetika on eeldatavalt esimest järku („ilma kasvuta kineetika”) ja uuritav aine laguneb „kometabolismi” teel. Esimest järku kineetika tähendab, et lagunemise kiirus (mg/l/ööpäev) on aja jooksul väheneva substraadi kontsentratsiooniga võrdeline. Tõelise esimest järku kineetika puhul on konkreetse aine lagunemise kiiruskonstant k sõltumatu ajast ja kontsentratsioonist. See tähendab, et k ei muutu märkimisväärselt katse jooksul ja on samasugune ka kõrgematel kontsentratsioonidel läbiviidud eri katsete puhul. Definitsiooni järgi on lagunemise kiiruskonstant k võrdne kontsentratsiooni suhtelise muutusega ajaühiku kohta: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Kuigi ettenähtud tingimustes on eeldatav kineetika tavaliselt esimest järku, võib esineda teatavaid olukordi, kus andmeid kirjeldab paremini muud tüüpi kineetika. Kõrvalekalle esimest järku kineetikast võib ilmneda näiteks siis, kui biomuundumist ei limiteeri bioloogilise reaktsiooni kiirus, vaid mingi massiülekande nähtus, nagu difusiooni kiirus. Siiski võib katseandmeid peaaegu alati kirjeldada pseudo-esimest järku kineetika abil, kui eeldada, et kiiruskonstant sõltub kontsentratsioonist.

▼**M1**

Katseplaani koostamise ja tulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks peavad enne katset olemas olema (nt standardsetest sõelkatsetest saadud) andmed uuritava aine biolagundatavuse kohta kõrgematel kontsentratsioonidel, abiootilise lagundatavuse, muundumissaaduste ja oluliste füüsikalis-keemiliste omaduste kohta. Täieliku biolagundatavuse määramiseks kasutatakse ^{14}C-märgisega uuritavat ainet ja määratakse ^{14}C jaotumine faaside vahel katse lõpus. Märgiseta uuritava aine puhul saab täielikku biolagundatavust määrata ainult kõrgete kontsentratsioonide kasutamisel ja tingimusel, et kõik olulised muundumissaadused on teada.

1.2. MÕISTED

Esmane biolagunemine on keemilise aine struktuuri muutumine (muundumine) mikroorganismide toimel, mille tulemusel aine kaotab oma keemilise identiteedi.

Funktsionaalne biolagunemine on keemilise aine struktuuri muutumine (muundumine) mikroorganismide toimel, mille tulemusena aine kaotab teatava omaduse.

Täielik aeroobne biolagunemine on hapniku juuresolekul mikroorganismide abil toimuv keemilise aine lagunemine (mineraliseerumine) süsinikdioksiidiks, veeks ja muude ainest esinevate elementide anorgaanilisteks sooladeks ning uute mikrobioloogilise sünteesi produktide ja biomassi teke.

Mineraliseerumine on keemilise aine või orgaanilise materjali lagunemine süsinikdioksiidiks, veeks ja muude ainest esinevate elementide anorgaanilisteks sooladeks mikroorganismide toimel.

Ootefaas on aeg katse algusest kuni hetkeni, millal lagundava toimega mikroorganismid on kohanenud ja keemilise aine või orgaanilise materjali biolagunemine on jõudnud avastatava tasemeni (10 protsendini maksimaalsest teoreetilisest lagunemisest või vähem, olenevalt mõõtemeetodi täpsusest).

Maksimaalne biolagunemise tase on keemilise aine või orgaanilise materjali katses registreeritud biolagunemise määr protsentides, millest edasi biolagunemine katses enam ei lähe.

Primaarne substraat on looduslike süsiniku- ja energiaallikate kogum, mis tagab mikroorganismide biomassi kasvu ja elutegevuse.

Sekundaarne substraat on nii madala kontsentratsiooniga substraadikomponent, et selle lagundamisest saavad asjaomased mikroorganismid üksnes tähtsusetu koguse süsinikku ja energiat, võrreldes süsiniku- ja energiakogusega, mille nad saavad substraadi peamiste komponentide (primaarsete substraatide) lagundamisest.

Lagunemise kiiruskonstant on esimest või pseudo-esimest järku kiiruskonstant k (ööpäev^{-1}), mis näitab lagunemise kiirust. Portskatses määratakse k pärast ootefaasi saadud lagunemiskõvera esimese osa alusel.

▼M1

Poolestusaeg $t_{1/2}$ (ööpäev) on mõiste, mida kasutatakse esimest järku reaktsiooni kiiruse iseloomustamiseks. See on aeg, mille jooksul aine kontsentratsioon väheneb kaks korda. Poolestusaeg ja lagunemise kiiruskonstant on seotud valemiga $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Poollagunemisaeg, DT_{50} (ööpäev) on mõiste, mida kasutatakse biolagunemiskatse tulemuse väljendamiseks. See on 50-protsendiliseks biolagunemiseks vajalik aeg (koos ootefaasiga).

Avastamislävi ja mõõtmislävi. Avastamislävi on aine kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa aine identsust tõendavat signaali eristada analüüsi artefaktidest. Mõõtmislävi on aine kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa kontsentratsiooni määrata nõutava täpsusega.

Lahustunud orgaaniline süsinik on veeproovis leiduva orgaanilise süsiniku osa, mida ei saa eemaldada teatava faaside eraldamisviisi abil, näiteks tsentrifuugimisega 40 000 ms^{-2} juures 15 minuti jooksul või filtrimisega läbi membraani, mille poori läbimõõt on 0,2–0,45 μm.

Orgaanilise ^{14}C üldaktiivsus on orgaanilise süsinikuga seotud ^{14}C üldaktiivsus.

Lahustunud orgaanilise ^{14}C aktiivsus on lahustunud orgaanilise süsinikuga seotud ^{14}C üldaktiivsus.

Tahkete osakestega seotud orgaanilise ^{14}C aktiivsus on tahkete osakestega seotud orgaanilise ^{14}C üldaktiivsus.

1.3. KATSE RAKENDATAVUS

Kõnesolev mudelkatse on rakendatav lendumatu või vähelenduva orgaanilise aine madalate kontsentratsioonide puhul. Atmosfääriõhule avatud kolvi (nt puuvillvatikorgiga kolvi) puhul võib praktiliselt lendumatuks pidada ainet, mille Henry konstant on väiksem kui umbes 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (umbes 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$). Kui kasutatakse suletud kolbi vaba ruumiga ülaosas, on võimalik uurida ka vähelenduvaid aineid (Henry konstant < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ või < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$), ilma et süsteemist läheks ainet kaduma. Kui CO_2 eemaldamisel ei kasutata vajalikke ettevaatusabinõusid, võib ^{14}C-märgisega ainet siiski kaotsi minna. Sel juhul võib olla vaja püüda CO_2 leelist sisaldavasse siseabsorberisse või kasutada välist CO_2 absorberit (otsene $^{14}CO_2$ määramine, vt 3. liide). Biolagunemise kineetika määramiseks peab uuritava aine kontsentratsioon olema madalam selle aine lahustuvusest vees. Tuleb siiski märkida, et kirjanduses esitatud vesilahustuvus võib olla oluliselt suurem uuritava aine lahustuvusest looduslikus vees. Väga halvasti lahustuva uuritava aine puhul võib lahustuvuse määramiseks kasutada sama vett, mida kasutatakse katses, kuid see ei ole kohustuslik.

Käesolevat metoodikat võib kasutada biolagunemise modelleerimiseks suuremaid osakesi mittesisaldavas pinnavees („pelaagiline katse”) või häguses pinnavees, mis võib esineda vee ja sette piirpinna läheduses (hõljumikatse).

▼M1

1.4. KATSE PÕHIMÕTE

Portskatses inkubeeritakse uuritavat ainet kas ainult pinnavees (pelaagiline katse) või pinnavees, millele on lisatud hõljuvainet (hõljumit) ja/või setet, nii et selle kuivmassi sisaldus on 0,01–1 g/l (hõljumikatse); viimasel juhul modelleeritakse veekogu, milles on hõljumit või taassuspendeeritud setet. Enamasti on pinnavee hõljumi ja/või hõljuvsette sisaldus eespool märgitud vahemiku madalamas osas. Katsekolbe inkubeeritakse valguse juurdepääsuta keskkonnatemperatuuril aeroobsetes tingimustes, segamisega. Lagunemise kineetika määratakse vähemalt kahel uuritava aine kontsentratsioonil. Kontsentratsioonid peavad teineteisest erinema 5–10 korda ja vastama uuritava aine eeldatavale kontsentratsioonivahemikule keskkonnas. Uuritava aine maksimaalne kontsentratsioon ei tohi ületada 100 µg/l ja on parem, kui see on alla 10 µg/l, kuna sel puhul vastab biolagunemine esimest järku kineetikale. Minimaalne kontsentratsioon ei tohi ületada 10 µg/l ja on parem, kui see on 1–2 µg/l või isegi madalam kui 1 µg/l. Müügilolevate ^{14}C-märgisega ainete kasutamisel saab nii madalaid kontsentratsioone tavaliselt hästi määrata. Muude analüüsimeetodite piiratud võimaluste tõttu on sageli võimatu mõõta uuritava aine kontsentratsiooni vajaliku täpsusega, kui selle algkontsentratsioon on ≤ 100 µg/l (vt punkt 1.7.2, teine lõik). Kui ei ole piisavalt madala avastamislävega analüüsimeetodit, siis võib oluliste muundumissaaduste identifitseerimiseks ja sisalduse mõõtmiseks kasutada uuritava aine kõrgemaid kontsentratsioone (> 100 µg/l, mõnikord > 1 mg/l). Kui kasutatakse uuritava aine kõrget kontsentratsiooni, siis ei saa katsetulemustest võib-olla hinnata lagunemise esimest järku kiiruskonstanti ja poolestusaega, kuna lagunemine tõenäoliselt ei vasta esimest järku kineetikale.

Lagunemist registreeritakse sobiva aja tagant, mõõtes kas ^{14}C jääkaktiivsust või (kui kasutatakse spetsiifilist keemilist analüüsi) uuritava aine jääkkontsentratsiooni. Kõige stabiilsema molekuliosa märgistamine ^{14}C-ga võimaldab mõõta täielikku mineraliseerumist, samas kui vähem stabiilse molekuliosa märgistamine ^{14}C-ga või spetsiifilise analüüsimeetodi kasutamine võimaldab hinnata esmast biolagunemist. Kõige stabiilsem molekuliosa ei pruugi siiski sisaldada olulist funktsionaalosa, mida võib seostada aine teatava eriomadusega, nagu toksilisus, bioakumulatsioon jne. Selle eriomaduse kao jälgimiseks võib niisugusel juhul olla vaja kasutada ^{14}C-märgistatud funktsionaalosaga uuritavat ainet.

1.5. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Käesolevas katses võib kasutada nii radioaktiivse märgisega kui ka märgiseta aineid. Soovitatakse kasutada märgistamist ^{14}C-ga, kusjuures märgis peab tavaliselt asuma kõige stabiilsemas (stabiilsemates) molekuli osas (osades) (vt ka punkt 1.4). Rohkem kui ühe aromaatse tsükliga molekulis on soovitatav märgistada ^{14}C-ga üks või mitu süsinikku igas tsüklis. Lisaks on soovitatav märgistada ^{14}C-ga üks või mitu süsinikku mõlemal pool kergesti lõhustatavat sidet. Uuritava aine keemiline ja radiokeemiline puhtusaste peab olema > 95 %. Et hõlbustada ^{14}C mõõtmist madala algkontsentratsiooniga katsetes, kasutatakse radiomärgisega aineid, mille eriaktiivsus on eelistatavalt umbes 50 µCi/mg (1,85 MBq) või kõrgem. Uuritava aine kohta on vaja teada järgmist:

▼**M1**

— lahustuvus vees [metoodika A.6];

— lahustuvus orgaanilises (orgaanilistes) lahustis (lahustites) (aine puhul, mida lisatakse lahustis või mis lahustub vees halvasti);

— dissotsiatsioonikonstant (pKa), kui aine seob või loovutab kergesti prootoneid [OECD TG 112] (5);

— aururõhk [metoodika A.4] ja Henry konstant;

— keemiline püsivus vees valguse juurdepääsuta (hüdrolüüs) [metoodika C.7].

Kui uuritakse vees vähelahustuva aine lagunemist merevees, võib olla kasulik teada ka soolamiskonstanti (Setšenovi konstant) K^s, mis on määratud valemiga $\log(S/S') = K^s C_m$, kus S ja S' on aine lahustuvus vastavalt magedas vees ja merevees ja C_m on soola molaarne kontsentratsioon.

Hõljumikatse puhul on vaja teada ka järgmist:

— jaotuskoefitsient süsteemis n-oktanool-vesi [metoodika A.8];

— adsorptsioonikoefitsient [metoodika C.18].

Kasulik on teada veel järgmist:

— uuritava aine kontsentratsioon keskkonnas, kui see on teada või seda on hinnatud;

— uuritava aine toksilisus mikroorganismidele [metoodika C.11];

— kergbiolagundatavus ja/või loomulik biolagundatavus [metoodikad C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)];

— aeroobne või anaeroobne biolagundatavus mullas ja muundumiskatsed süsteemis setted-vesi [metoodikad C.23, C.24].

1.6. STANDARDAINE

Tavaliselt kasutatakse standardainena aeroobsetes tingimustes kergesti biolagundatavat ainet (nt aniliin või naatriumbensoaat). Aniliini ja naatriumbensoaadi eeldatav biolagunemise aeg on tavaliselt alla kahe nädala. Standardainega kontrollitakse, et katses kasutatava vee mikroorganismide aktiivsus oleks teatavates piirides, st et vees oleks aktiivne mikroorganismide populatsioon.

▼M1

1.7. KVALITEEDIKRITEERIUMID

1.7.1. **Saagis**

Pärast uuritava aine lisamist kontrollitakse iga katsetatavat algkontsentratsiooni kohe ^{14}C aktiivsuse mõõtmisega või, märgistamata aine puhul, keemilise analüüsiga vähemalt kahes paralleelproovis. Nii saadakse andmeid asjaomase analüüsimeetodi rakendatavuse ja korratavuse ning uuritava aine jaotuse ühtluse kohta. Edasisel andmete analüüsil ei kasutata tavaliselt nominaalset kontsentratsiooni, vaid mõõdetud ^{14}C algaktiivsust või uuritava aine algkontsentratsiooni, kuna sellega kompenseeritakse sorptsioonist tingitud ainekaod ja doseerimisvead. ^{14}C-märgisega uuritava aine korral võib aine saagise katse lõpus leida massibilansi koostamisega (vt punkt 1.8.9.4, viimane lõik). Paremal juhul on radiomärgisega aine massibilansist leitud saagis 90–110 %, samas kui radiomärgiseta aine saagis on olenevalt analüüsimeetodi täpsusest 70–110 %. Neid vahemikke ei tule pidada katse nõuetele vastavuse kriteeriumideks; neid tuleb tõlgendada sihtvahemikena. Analüüsi täpsuse võib määrata ka algkontsentratsioonist madalamal uuritava aine kontsentratsioonil ning oluliste muundumissaaduste puhul, kuid see ei ole kohustuslik.

1.7.2. **Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus**

Et kontrollida analüüsimeetodi korratavust uuritava aine ja, vajaduse korral, muundumissaaduste sisalduse mõõtmisel (kaasa arvatud esmase ekstraheerimise tõhusus), tehakse viis pinnavee üksikekstraktide paralleelanalüüsi.

Võimaluse korral ei tohiks uuritava aine ja muundumissaaduste puhul analüüsimeetodi avastamislävi olla kõrgem kui 1 % katsesüsteemi lisatud aine algkontsentratsioonist. Mõõtmislävi ei tohiks ületada 10 % algkontsentratsioonist. Paljude orgaaniliste ainete ja nende muundumissaaduste keemiliseks analüüsiks on sageli vaja, et lisatud uuritava aine algkontsentratsioon oleks suhteliselt kõrge (> 100 μg/l).

1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.8.1. **Seadmed**

Katse tehakse vajaliku mahuga (nt 0,5- või 1,0-liitristes) silikoon- või kummikorgiga suletud koonilistes kolbides, silindrikujulistes pudelites või CO_2-kindlalt (nt butüülkummist septumiga) suletud seerumipudelites. Üks võimalus on teha katse suure arvu nõudega ja võtta igal proovivõtuajal prooviks vähemalt kahe paralleelnõu kogu sisu (vt punkt 1.8.9.1, viimane lõik). Radiomärgiseta lendumatu uuritava aine korral ei ole gaasikindel kork või septum vajalik, selle asemel sobib mittetihe puuvillvatikork, mille abil välditakse saastumist õhu kaudu (vt punkt 1.8.9.1, teine lõik). Vähelenduvaid aineid katsetatakse biomeetrilaadses seadmes, milles veepinda nõrgalt segatakse. Baktersaaste vältimiseks võib katsenõu enne kasutamist steriliseerida kuumutamise või autoklaavimisega, kuid see ei ole kohustuslik. Lisaks sellele kasutatakse järgmisi tavalisi laboriseadmeid:

— plaatloksuti või magnetsegajad katsenõude pidevaks segamiseks;

▼M1

— tsentrifuug;

— pH-meeter;

— turbidimeeter hägususe nefelomeetriliseks määramiseks;

— ahi või mikrolaineahi kuivmassi määramiseks;

— membraanfiltrimise seade;

— autoklaav või ahi klaasnõude kuumsteriliseerimiseks;

— vahendid ^{14}C-märgisega aine käitlemiseks;

— seade ^{14}C aktiivsuse mõõtmiseks süsinikdioksiidi neelavast lahusest võetud proovis ja vajaduse korral setteproovis;

— analüüsiseade uuritava ja standardaine määramiseks, kui kasutatakse spetsiifilist keemilist analüüsi (nt gaasikromatograaf, kõrgefektiivne vedelikkromatograaf).

1.8.2. **Uuritava aine põhilahus**

Uuritava ja standardaine põhilahuste valmistamiseks kasutatakse deioniseeritud vett (vt punkt 1.8.7, esimene lõik). Deioniseeritud vesi ei tohi sisaldada mikroorganismidele mürgiseid aineid ning üle 1 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku (6).

1.8.3. **Pinnavee võtmine ja vedu**

Pinnavee võtmise koht valitakse igal konkreetsel juhtumil vastavalt katse eesmärgile. Veevõtukoha valikul tuleb arvestada võimalikke varasemaid põllumajanduse, tööstuse või olmemõjusid. Kui on teada, et eelneva nelja aasta jooksul saastati veekogu uuritava ainega või selle struktuurianaloogidega, ei tohi sellest veekogust katsevett võtta, välja arvatud juhul, kui uurija eesmärk ongi lagunemiskiiruse kindlakstegemine eelnevalt saasteainega kokku puutunud keskkonnas. Veevõtukohas mõõdetakse vee pH ja temperatuur. Registreeritakse proovivõtu sügavus ja antakse veeproovi väline iseloomustus (nt värvus ja hägusus) (vt punkt 3). Aeroobsete tingimuste olemasolu tõendamiseks mõõdetakse hapnikusisaldus ja/või redokspotentsiaal vees ja setete pinnakihis, kui aeroobsete tingimuste olemasolu ei ole ilmne juba eelnevast kogemusest ning veevõtukoha laadist. Pinnavett veetakse täiesti puhtas nõus. Transpordi ajal ei tohi proovi temperatuur oluliselt ületada katsetemperatuuri. Kui vedu kestab üle 2–3 tunni, soovitatakse proov jahutada temperatuurini 4 °C. Veeproovi ei tohi külmutada.

▼M1

1.8.4. **Pinnavee hoidmine ja ettevalmistamine**

Katset on parem alustada üks ööpäev pärast proovivõttu. Kui vett on vaja säilitada, peab säilitusaeg olema võimalikult lühike ja ei tohi ületada nelja nädalat. Säilitamisel aereeritakse veeproovi 4 °C juures kuni kasutamiseni. Enne kasutamist kõrvaldatakse veeproovist suuremad tahked osakesed näiteks filtrimisega läbi nailonfiltri, mille ava läbimõõt on umbes 100 µm, läbi suurepoorilise paberfiltri või sadestamisega.

1.8.5. **Sette lisamine veele (mittekohustuslik)**

Hõljumikatseks vajaliku suspensiooni saamiseks lisatakse looduslikku vett sisaldavasse nõusse pindmist setet (mis on filtritud suuremate tahkete osakeste eemaldamiseks vastavalt punktile 1.8.4); suspendeeritud tahke aine sisaldus peab olema vahemikus 0,01–1 g/l. Pindmine sete peab pärinema veeprooviga samast kohast. Olenevalt konkreetsest veekeskkonnast võib pindmine sete olla suure orgaanilise süsiniku sisalduse (2,5–7,5 %) ja peeneteralise lõimisega või väikese orgaanilise süsiniku sisalduse (0,5–2,5 %) ja jämeteralise lõimisega (3). Pindmine sete valmistatakse ette järgmiselt: läbipaistva plasttoru abil võetakse mitu settesüdamikku; kohe pärast proovi võtmist lõigatakse ära iga südamiku ülemine aeroobne osa (kuni 5 mm paksune pindmine kiht) ja segatakse need osad kokku. Saadud setteproovi transporditakse nõus, mille ülaosas on palju õhuga täidetud ruumi, mis tagab settele aeroobsed tingimused (kui vedu kestab üle 2–3 tunni, jahutatakse nõu temperatuurini 4 °C). Setteproov suspendeeritakse uuritavas vees, nii et proovi ja vee suhe oleks 1:10, ja hõljumit aereeritakse 4 °C juures kuni kasutamiseni. Kui setet on vaja säilitada, peab säilitusaeg olema võimalikult lühike ega tohi ületada nelja nädalat.

1.8.6. **Poolpidev menetlus (mittekohustuslik)**

Kui uuritava aine olulist lagunemist on võimalik mõõta alles pärast pika ootefaasi möödumist, võib olla vajalik pikk inkubatsiooniperiood (mitu kuud). Kui see on teada uuritava ainega tehtud eelkatsetest, võib katse alguses kasutada poolpidevat režiimi, milles osa katsevett või hõljumit perioodiliselt uuendatakse (vt 2. liide). Teine võimalus on muuta tavaline portskatse poolpidevaks pärast seda, kui umbes 60 katsepäevaga ei ole portsrežiimis saavutatud uuritava aine lagunemist (vt punkt 1.8.8.3, teine lõik).

1.8.7. **Uuritava aine (või standardaine) lisamine**

Kui uuritav aine lahustub vees hästi (> 1 mg/l) ja on vähelenduv (Henry konstant < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ või < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), võib põhilahuse valmistada deioniseeritud vees (vt punkt 1.8.2); vajaliku kontsentratsiooni saamiseks lisatakse katsenõusse vajalik maht põhilahust. Lisatava põhilahuse maht peab olema võimalikult väike (< 10 % vedeliku lõppmahust, kui võimalik). Teine võimalus on lahustada uuritav aine suuremas mahus katsevees, seda võib käsitleda alternatiivina orgaanilise lahusti kasutamisele.

▼M1

Äärmisel juhul võib lendumatu vähelahustuva aine põhilahuse valmistada lenduvas orgaanilises lahustis, kuid katsesüsteemi lisatava lahusti kogus ei tohi ületada 1 mahuprotsenti ja pärssida mikroorganismide aktiivsust. Lahusti ei tohi mõjutada uuritava aine stabiilsust vees. Lahusti eemaldatakse, kuni lahusesse jääv väga väike lahustikogus enam oluliselt ei suurenda lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust katsevees või -hõljumis. Selle kontrollimiseks tehakse ainespetsiifiline analüüs või, võimaluse korral, lahustunud orgaanilise süsiniku analüüs (6). Lisatava lahusti kogus peab olema võimalikult väike ja uuritav aine peab olema täielikult lahustunud katsevee lõppmahus. Uuritava aine lisamiseks katsenõusse võib kasutada ka teisi publikatsioonides (7, 8) kirjeldatud võtteid. Kui uuritava aine lisamiseks kasutatakse orgaanilist lahustit, tuleb lahusti mõju kontrolliks ette nähtud katseveega nõu (mis ei sisalda lisatud aineid) ja katseveega nõu, mis sisaldab lisatud standardainet, käidelda samal viisil kui tegelikku katsenõu, millesse on lisatud kandelahustis lahustatud uuritav aine. Lahusti mõju kontrollimise eesmärk on standardaine lagunemiskiiruse jälgimisega näidata, et lahusti ei pärsi mikroorganismide populatsiooni.

1.8.8. **Katsetingimused**

1.8.8.1. *Katsetemperatuur*

Inkubeerimine toimub (eelistatavalt) valguse juurdepääsuta või hajuvalguses püsival temperatuuril (± 2 °C), milleks võib olla välistemperatuur või standardtemperatuur (20–25 °C). Välistemperatuur võib olla kas tegelik proovi temperatuur proovi võtmisel või proovivõtukoha keskmine temperatuur.

1.8.8.2. *Loksutamine või segamine*

Et tahked osakesed ja mikroorganismid püsiksid hõljumis, tuleb katsenõu pidevalt loksutada või segada. Loksutamine või segamine soodustab ka hapniku transporti nõus olevast õhust vedelikku, mis tagab nõutavate aeroobsete tingimuste püsimise. Katsenõud asetatakse plaatloksutile (ligikaudu 100 võnget minutis) või magnetsegajale. Loksutamine või segamine peab olema pidev. Loksutamine või segamine peab olema võimalikult nõrk, kuid tagama homogeense suspensiooni püsimise.

1.8.8.3. *Katse kestus*

Katse kestab tavaliselt kuni 60 ööpäeva, välja arvatud juhul, kui kasutatakse poolpidevat režiimi, milles katsehõljumit perioodiliselt uuendatakse (vt punkt 1.8.6 ja 2. liide). Kui uuritava aine lagunemine algab 60 esimese katsepäeva jooksul, võib portskatset siiski pikendada kuni 90 ööpäevani. Lagunemist kontrollitakse vajaliku aja tagant lahuses oleva ^{14}C jääkaktiivsuse või eraldunud $^{14}CO_2$ aktiivsuse määramisega (punkt 1.8.9.4) ja/või keemilise analüüsiga (punkt 1.8.9.5). Inkubatsiooniaeg peab olema piisav lagunemisprotsessi hindamiseks. Oleks hea, kui katses laguneks üle 50 % ainest; aeglaselt laguneva aine korral peab lagunema piisavalt palju (tavaliselt üle 20 %) ainet selleks, et hinnata lagunemise kiiruskonstanti.

▼M1

Katsesüsteemis mõõdetakse korduvalt pH-d ja hapnikusisaldust, kui eelnevad samalaadsed katsed samast kohast võetud vee- ja setteproovidega ei ole näidanud, et sellist kontrollimist ei ole vaja. Mõnikord võib vees või settes palju kõrgemas kontsentratsioonis olevate primaarsete substraatide tarbimine põhjustada nii rohket CO_2 eraldumist ja hapnikukulu, et katse jooksul muutuvad oluliselt katsetingimused.

1.8.9. **Katse läbiviimine**

1.8.9.1. *Nõude ettevalmistamine pelaagiliseks katseks*

Katsenõudesse pannakse sobiv kogus katsevett, nii et ligikaudu üks kolmandik nõu mahust oleks täidetud ja igas nõus oleks vähemalt 100 ml vett. Kui katse tehakse suure arvu nõudega (ja igal proovivõtuajal võetakse prooviks teatavate katsenõude kogu sisu), on katsevee vajalik maht samuti umbes 100 ml, sest liiga väike proovi maht võib mõjutada ootefaasi pikkust. Uuritav aine lisatakse põhilahusena, nagu on kirjeldatud punktides 1.8.2 ja 1.8.7. Lagunemise kineetika määramiseks ja lagunemise kiiruskonstandi arvutamiseks kasutatakse vähemalt kahte uuritava aine kontsentratsiooni, mille väärtused erinevad 5–10 korda. Mõlemad kontsentratsioonid peavad olema alla 100 μg/l ja eelistatavalt vahemikus 1–10 μg/l.

Katsenõud suletakse õhu- ja CO_2-kindla korgi või kaanega. ^{14}C-märgiseta lendumatu uuritava aine korral sobib mittetihe puuvillvatikork, mis hoiab ära saastumise õhu kaudu (vt punkt 1.8.1); seejuures peavad võimalikud peamised lagunemisproduktid olema teadaolevalt lendumatud ning CO_2 määratakse kaudselt (vt 3. liide).

Katsenõusid inkubeeritakse valitud temperatuuril (vt punkt 1.8.8.1). Keemiliseks analüüsiks või ^{14}C mõõtmisteks võetakse proovid katse alguses (enne biolagunemise algust; vt punkt 1.7.1) ja seejärel katse jooksul sobiva aja tagant. Proovivõtt seisneb kas igast paralleelnõust osaproovide võtmises (5 ml alikvoodid) või igal proovivõtuajal kogu katsenõu sisu ärakasutamises. Uuritava aine mineraliseerumist võib määrata kas kaudselt või otse (vt 3. liide). Kiiruskonstandi usaldusväärse hinnangu saamiseks on tavaliselt vaja lagunemisfaasi jooksul (pärast ootefaasi lõppu) võtta proovid vähemalt viie andmepunkti jaoks; kiiresti laguneva aine korral võib piirduda kolme punktiga, kui saab tõendada, et neist piisab. Kui uuritav aine ei lagune kiiresti, on lagunemisfaasi ajal kerge teha ka rohkem mõõtmisi, sellepärast tuleks kineetilise konstandi hindamiseks kasutada rohkem andmepunkte. Kuna biolagunemise kiirused on erinevad, ei saa kindlat proovivõtu ajagraafikut ette anda; aeglase lagunemise korral soovitatakse siiski võtta proove üks kord nädalas. Kui uuritav aine on kiiresti biolagundatav, tuleb kolmel esimesel katsepäeval võtta proov iga päev ja seejärel igal teisel või kolmandal päeval. Mõnikord, näiteks kui aine hüdrolüüsub väga kiiresti, võib olla vaja võtta proove iga tunni tagant. Enne katset soovitatakse teha eeluuring sobivate proovivõtuaegade kindlaksmääramiseks. Kui proove on vaja ka edasisteks keemilisteks analüüsideks, on soovitatav võtta rohkem proove ja seejärel valida katse lõpus analüüsitavad proovid tagurpidises järjekorras, st viimaseid proove analüüsitakse esimestena (proovide stabiilsuse tagamise kohta säilitamise ajal vt punkt 1.8.9.5, teine lõik).

▼**M1**

1.8.9.2. *Katsenõude ja proovide arv*

Valmistatakse ette piisav arv katsenõusid, et oleksid:

— katsenõud: vähemalt kaks (parem kolm) paralleelnõu igal uuritava aine kontsentratsioonil või (kui prooviks võetakse teatavate katsenõude kogu sisu) suur arv katsenõusid igal kontsentratsioonil (nõu tähis on F_T);

— katsenõud massibilansi arvutamiseks: vähemalt kaks paralleelnõu igal uuritava aine kontsentratsioonil (nõu tähis on F_M);

— ilma uuritava aineta pimekatsenõu: vähemalt üks ainult katsevett sisaldav pimekatsenõu (nõu tähis on F_B);

— standardainega kontrollnõud: kaks paralleelnõu standardainega (nt aniliin või naatriumbensoaat, 10 µg/l) (nõu tähis on F_C). Standardainega kontrollnõusid on vaja minimaalse mikroorganismide aktiivsuse olemasolu kinnitamiseks. Kui see on otstarbekohane, võib radiomärgisega standardainet kasutada ka siis, kui uuritava aine lagunemist jälgitakse keemilise analüüsiga;

— steriilsed kontrollnõud: üks või kaks steriliseeritud katseveega nõu, et kontrollida uuritava aine võimalikku abiootilist lagunemist või muud mittebioloogilist kadu (nõu tähis on F_S). Bioloogilise aktiivsuse võib kõrvaldada katsevee autoklaavimise (121 °C, 20 minutit), mürgi lisamise (nt naatriumasiid (NaN_3), 10–20 g/l, elavhõbe(II)kloriid, $HgCl_2$, 100 mg/l, või formaliin, 100 mg/l) või gammakiirituse abil. Kui kasutatakse $HgCl_2$, tuleb katsete jäätmed kõrvaldada mürgiste jäätmete eeskirjade kohaselt. Kui veele on lisatud rohkesti setet, on steriilsust raske saavutada; sellisel juhul soovitatakse näiteks kolmekordset autoklaavimist. Tuleb arvestada, et autoklaavimine võib mõjutada sette sorptsiooniomadusi.

— lahusti kontrollnõud, milles on katsevesi ja katsevesi standardainega: kaks paralleelnõu, mille sisule on lisatud lahustit samas koguses ja samal viisil kui uuritava aine lisamisel. Neid nõusid on vaja, et standardaine lagunemise määramisega kontrollida lahusti võimalikku kahjulikku mõju.

Katse planeerimisel peab uurija arvestama, et parem on teha rohkem paralleelkatseid kui suurendada proovivõtukordade arvu. Vajalike nõude täpne arv oleneb lagunemise mõõtmise meetodist (vt punkt 1.8.9.1, kolmas lõik; punkt 1.8.9.4 ja 3. liide).

▼**M1**

Igal proovivõtuajal võetakse igast katsenõust kaks osaproovi (nt 5 ml alikvoodid). Kui kasutatakse suurt arvu nõusid ja prooviks võetakse katsenõu kogu sisu, moodustatakse iga proov vähemalt kahe nõu sisust (vt punkt 1.8.9.1, esimene lõige).

1.8.9.3. *Nõude ettevalmistamine hõljumikatseks (mittekohustuslik)*

Katsenõudesse lisatakse nõutav maht katsevett ja vajaduse korral setet (vt punkt 1.8.5). Hõljumikatse nõud valmistatakse ette samal viisil kui pelaagilise katse nõud (vt punktid 1.8.9.1 ja 1.8.9.2). Parem on kasutada seerumipudeleid või samalaadse kujuga nõusid. Suletud nõud asetatakse loksutile horisontaalselt. ^{14}C-märgiseta lendumatu uuritava ainega avatud nõud pannakse muidugi püstasendisse; sel juhul soovitatakse kasutada magnetsegajat ja klaasiga kaetud magnetilisi segamispulkasid. Vajaduse korral aereeritakse pudeleid nõuetekohase õhustatuse tagamiseks.

1.8.9.4. *Radiokeemiline määramine*

Eraldunud $^{14}CO_2$ mõõdetakse kaudselt ja otse (vt 3. liide). $^{14}CO_2$ kaudseks määramiseks kasutatakse järgmist vahet: katsevees või -hõljumis leiduva ^{14}C algaktiivsusest lahutatakse summaarne jääkaktiivsus proovivõtuhetkel, mis mõõdetakse pärast proovi pH viimist väärtuseni 2–3 ja CO_2 eemaldamist. Kuna anorgaaniline süsinik eemaldatakse, pärineb mõõdetav jääkaktiivsus üksnes orgaanilisest materjalist. Kaudset $^{14}CO_2$ määramist ei kasutata, kui uuritava aine olulised muundumissaadused on lenduvad (vt 3. liide). Võimaluse korral tuleb igal proovivõtul mõõta otse vähemalt ühest katsenõust eralduv $^{14}CO_2$ (vt 3. liide); see meetod võimaldab kontrollida nii massibilanssi kui ka biolagunemist, kuid seda saab rakendada ainult suletud nõus tehtava katse korral.

Katse jooksul eraldunud $^{14}CO_2$ otseseks mõõtmiseks valmistatakse katseks ette rohkem nõusid. Otsest $^{14}CO_2$ määramist soovitatakse siis, kui uuritava aine olulised muundumissaadused on lenduvad. Iga andmepunkti saamiseks viiakse katsenõu sisu pH väärtuseni 2–3 ja $^{14}CO_2$ kogutakse sise- või välisabsorberisse (vt 3. liide).

^{14}C-märgisega uuritava aine ja oluliste muundumissaaduste kontsentratsioonid võib määrata kas radiokromatograafiliselt (õhukese kihi kromatograafia, radioloogiline õhukese kihi kromatograafia) või radiokeemilise detektsiooniga kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil.

Soovi korral võib määrata ka, kuidas on faaside vahel jaotunud jääkradioaktiivsus (vt 1. liide), lagunemata uuritav aine ja muundumissaadused.

▼**M1**

Massibilansi kontrollimiseks mõõdetakse katse lõpus otseselt $^{14}CO_2$, kasutades selleks eraldi katsenõu, millest ei ole katse käigus proove võetud (vt 3. liide).

1.8.9.5. *Keemiline analüüs*

Tundliku analüüsimeetodi olemasolu korral võib esmase biolagunemise hindamiseks kasutada radioaktiivse märgistamise asemel uuritava aine jääkkontsentratsiooni mõõtmist. Kui mineraliseerumise ulatuse mõõtmiseks kasutatakse radiomärgisega ainet, võib paralleelselt teha ka keemilise analüüsi, mis võimaldab saada lisateavet ja kontrollida meetodit. Keemilist analüüsi võib kasutada ka uuritava aine lagunemise käigus tekkinud muundumissaaduste mõõtmiseks, seda soovitatakse ainete puhul, mille mineraliseerumise poolestusaeg on üle 60 ööpäeva. Igal proovivõtukorral mõõdetakse ning registreeritakse (absoluutsetes ühikutes ja protsendina algsisaldusest) uuritava aine ja muundumissaaduste kontsentratsioonid. Üldiselt tuleb identifitseerida iga muundumissaadus, mille sisaldus teataval proovivõtukorral on $\geq$ 10 % uuritava aine algkontsentratsioonist; identifitseerimata jätmine peab olema mõistlikult põhjendatud. Kui teatava muundumissaaduse kontsentratsioon katse jooksul pidevalt kasvab, võib see osutada selle saaduse püsivusele; sellepärast tuleb kaaluda sellise saaduse identifitseerimist ka siis, kui selle kontsentratsioon ei ületa eespool märgitud piirmäära. Kui uuritav aine võib kiiresti abiootiliselt muunduda (nt hüdrolüüsuda), tuleb kaaluda muundumissaaduste analüüsimist steriilsete kontrollkatsete abil. Muundumissaaduste identifitseerimise ja sisalduse mõõtmise vajadust kaalutakse iga juhtumi puhul eraldi ja põhjendatakse katseprotokollis. Orgaanilise lahustiga ekstraheerimist rakendatakse asjaomase analüüsimeetodi juhiste kohaselt.

Kui analüüs toimub hiljemalt 24 tundi pärast proovi võtmist, hoitakse proovi õhukindlas nõus 2–4 °C juures (eelistatav). Pikemaks säilitamiseks külmutatakse proov temperatuurini alla –18 °C või konserveeritakse keemiliselt. Proovi konserveerimiseks ei soovitata hapestamist, sest hapestatud proov võib olla ebapüsiv. Kui proovi ei analüüsita 24 tunni jooksul ja seda on vaja kauem säilitada, tuleb teha säilivusuuring ja tõendada, et uuritavad keemilised ained on temperatuuril alla –18 °C või konserveeritult säilitamisel stabiilsed. Kui asjaomane analüüsimeetod hõlmab ekstraheerimist lahustiga või tahkefaas-ekstraheerimist, tuleb aine ekstraheerida kohe pärast proovi võtmist või pärast proovi säilitamist külmutatult kuni 24 tundi.

Analüüsimeetodi tundlikkusest olenevalt võib olla vaja võtta suuremaid proove, kui on märgitud punktis 1.8.1. Katset on kerge teha 2–3-liitristes nõudes: igasse nõusse pannakse 1 liiter katsevett ja võetakse umbes 100-milliliitriseid proove.

▼M1

2. **KATSEANDMED JA NENDE ESITAMINE**

2.1. ANDMETE TÖÖTLEMINE

2.1.1. **Andmete graafiline esitamine**

Proovivõtuajad ümardatakse täistundideks (välja arvatud juhul, kui aine laguneb oluliselt minutite või tundide jooksul), mitte täisööpäevadeks. Uuritava aine jääkaktiivsuse (^{14}C-märgisega aine) või jääkkontsentratsiooni (märgistamata aine) hinnatud väärtused esitatakse sõltuvalt ajast graafiliselt nii lineaarses kui ka poollogaritmilises skaalas (vt joonised 1a ja 1b). Kui on toimunud lagunemine, võrreldakse nõudega F_T saadud tulemusi nendega, mis on saadud nõudega F_S. Kui uuritava ainega nõude (F_T) puhul saadud tulemuste keskväärtus erineb steriilsete nõudega (F_S) saadud keskväärtusest vähem kui 10 %, võib oletada, et täheldatud lagunemine on valdavalt abiootiline. Kui lagunemise määr nõudes F_S on väiksem, siis võib neid andmeid kasutada nõudes F_T toimunud biolagunemise määra hindamisel parandina (vastav arv lahutatakse). Kui tehakse mittekohustuslik oluliste muundumissaaduste analüüs, esitatakse lisaks uuritava aine vähenemise graafikule ka muundumissaaduste tekkimist ja kadumist kajastavad graafikud.

Ootefaasi kestuse t_L hindamiseks ekstrapoleeritakse lagunemiskõvera (poollogaritmilise graafiku) lineaarne osa null-lagunemise tasemeni või määratakse ligikaudu 10 % lagunemise aeg (vt joonised 1a ja 1b). Poollogaritmiliselt graafikult leitakse esimest järku kiiruskonstandi k ja selle standardhälbe hinnang, kasutades lineaarset regressiooni ln (^{14}C jääkaktiivsus või uuritava aine jääkkontsentratsioon) *vs*. aeg. Eriti ^{14}C mõõtmise puhul tuleb kasutada ainult neid andmeid, mis kuuluvad ootefaasile järgnevasse lagunemiskõvera esimesse lineaarsesse osasse; paljude suure määramatusega andmete asemel on parem koguda väiksem arv representatiivseid andmeid. Antud juhul hõlmab määramatus vigu, mis on seotud mõõdetud ^{14}C jääkaktiivsuse soovitatud otsese kasutamisega (vt edaspidi). Kui lagunemine on kahefaasiline, on mõnikord vaja arvutada kaks kiiruskonstanti. Selleks määratakse kindlaks lagunemiskõvera kaks faasi. Kui ühest ja samast nõust võetakse osaproove, arvutatakse kiiruskonstant k ja poolestusaeg $t_{½}$ = ln 2/k iga paralleelnõu jaoks eraldi; kui igal proovivõtukorral võetakse prooviks katsenõu kogu sisu, arvutatakse need parameetrid keskväärtuste alusel (vt punkt 1.8.9.2, viimane lõik). Esimese meetodi korral esitatakse iga paralleelnõu jaoks leitud kiiruskonstant ja poolestusaeg ning nende keskväärtused koos standardhälvetega. Uuritava aine kõrge kontsentratsiooni puhul võib lagunemiskõver (poollogaritmiline graafik) sirgjoonest märkimisväärselt kõrvale kalduda ja esimest järku kineetika ei kehti. Sel juhul ei ole poolestusaja määramisel mõtet. Piiratud andmevahemikus saab siiski rakendada pseudo-esimest järku kineetikat ja määrata poollagunemisaeg DT_{50} (aeg, mille jooksul laguneb 50 % ainest). Ent tuleb silmas pidada, et DT_{50} abil ei saa ennustada lagunemise ajalist kulgu väljaspool valitud andmevahemikku, sest DT_{50} iseloomustab ainult valitud andmekogumit. Kuna statistilisi arvutusi ja kõverate lähendamist hõlbustavad analüüsiprogrammid on kergesti kättesaadavad, on soovitatav kasutada asjaomast tarkvara.

▼M1

Kui kasutatakse keemilist analüüsi, määratakse esmase lagunemise kiiruskonstant ja poolestusaeg samal viisil, nagu kirjeldati eespool mineraliseerumise üldmäära mõõtmise puhul. Kui esmane lagunemine on limiteeriv protsess, võib mõnikord kasutada ka lagunemise üldmäära iseloomustavaid andmepunkte. Seda võib teha, kuna ^{14}C aktiivsuse mõõtmisest erinevalt on antud juhul otsene mõõtmine.

Kui kasutatakse ^{14}C-märgisega ainet, koostatakse vähemalt katse lõpus massibilanss, mis väljendatakse lisatud aine algkontsentratsiooni protsentides.

2.1.2. **Jääkaktiivsus**

Orgaanilise aine ^{14}C-märgisega osa lagunemisel läheb suurem osa isotoobist ^{14}C üle $^{14}CO_2$-ks; muu osa kasutatakse biomassi kasvatamiseks ja/või rakuväliste ainevahetussaaduste sünteesimiseks. Järelikult ei muundu aine täielikul „lõplikul" biolagunemisel kogu tema süsinik $^{14}CO_2$-ks. Biosünteesi produktidesse seotud ^{14}C vabaneb aeglaselt $^{14}CO_2$-na hiljem toimuval teisesel mineraliseerumisel. Graafikutel, mis kajastavad orgaanilise ^{14}C jääkaktiivsuse (mõõdetakse pärast CO_2 eemaldamist) või eraldunud $^{14}CO_2$ aktiivsuse sõltuvust ajast, esineb sellepärast pärast lagunemise lõppu järelfaas. See raskendab andmete kineetilist tõlgendamist ja sellepärast kasutatakse lagunemise kiiruskonstandi määramiseks tavaliselt ainult kõvera esimest osa, mis järgneb ootefaasile ja lõpeb enne, kui on lagunenud umbes 50 % ainest. Kui uuritav aine laguneb, on orgaanilise ^{14}C üldine jääkaktiivsus alati suurem kui lagunemata uuritava ainega seotud ^{14}C aktiivsus. Kui uuritava aine lagunemine on esimest järku reaktsioon ja CO_2-ni mineraliseerub konstantne osa α, on ^{14}C kadumise kõvera (summaarne orgaaniline ^{14}C *vs*. aeg) algtõus võrdne α ja uuritava aine (täpsemalt, uuritava aine ^{14}C-märgisega osa) kontsentratsiooni kajastava kõvera tõusu korrutisega. Järelikult, kui kasutatakse orgaanilise ^{14}C summaarse aktiivsuse mõõtmise tulemusi ilma parandusteta, on arvutatud lagunemise kiiruskonstant tegelikust väiksem. Mitmesugustel lihtsustavatel eeldustel põhinevaid meetodeid, kuidas mõõdetud radiokeemilise aktiivsuse järgi hinnata uuritava aine kontsentratsiooni, on kirjeldatud reas publikatsioonides (2, 9, 10, 11). Neid meetodeid on kõige lihtsam kasutada kiiresti lagundatavate ainete puhul.

2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kui selgub, et k ei olene lisatud aine kontsentratsioonist (st uuritava aine eri kontsentratsioonidel arvutatakse enam-vähem ühesugused k väärtused), siis võib järeldada, et see esimest järku kiiruskonstant tõesti kirjeldab seda reaktsiooni kasutatud katsetingimustes (uuritav aine, veeproov, katsetemperatuur). Kuivõrd saadud tulemust võib üldistada või ekstrapoleerida muudele süsteemidele, tuleb selgitada eksperdihinnanguga. Kui kasutatakse uuritava aine kõrget kontsentratsiooni ja lagunemine ei järgi esimest järku kineetikat, ei saa katseandmeid kasutada esimest järku kiiruskonstandi või vastava poolestusaja otseseks määramiseks. Uuritava aine kõrgel kontsentratsioonil saadud katseandmeid võib siiski kasutada mineraliseerumise üldmäära hindamiseks ja/või muundumissaaduste identifitseerimiseks ja kvantitatiivseks kirjeldamiseks.

▼M1

Kui on teada, millise kiirusega toimuvad teised aine kadu põhjustavad protsessid peale biolagunemise (nt hüdrolüüs või lendumine), võib biolagunemise ligikaudse kiiruse hindamisel lahutada need kiirused katses mõõdetud üldkiirusest. Andmeid hüdrolüüsi kohta võib saada näiteks steriilsest kontrollkatsest või kõrgemal uuritava aine kontsentratsioonil tehtud paralleelkatsest.

$^{14}CO_2$ kaudset ja otsest määramist (punkt 1.8.9.4 ja 3. liide) võib kasutada ainult selleks, et mõõta uuritava aine mineraliseerumist CO_2-ni. ^{14}C-märgisega uuritava aine kontsentratsiooni ja oluliste muundumissaaduste tekke analüütiliseks määramiseks võib kasutada radiokromatograafiat (radioloogilist õhukese kihi kromatograafiat) või kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (punkt 1.8.9.4, kolmas lõik). Poolestusaega saab otse määrata juhul, kui lagunemisel ei teki olulisi muundumissaadusi (definitsiooni kohaselt loetakse oluliseks muundumissaaduseks ainet, mille kontsentratsioon on vähemalt 10 % uuritava aine algkontsentratsioonist). Kui sellised olulised muundumissaadused siiski tekivad, tuleb andmeid üksikasjalikult hinnata. Selleks võib olla vaja muundumissaadusi korduvalt määrata ja/või identifitseerida (vt punkt 1.8.9.5, esimene lõik), välja arvatud juhul, kui muundumissaaduste edasist käitumist saab kogemuste (nt lagunemisteed käsitlevate andmete) alusel põhjendatult hinnata. Kuna see, millises ulatuses uuritava aine süsinik muundub CO_2-ks, sõltub oluliselt uuritava aine ja muude substraatide kontsentratsioonist, katsetingimustest ja mikroobikooslusest, ei saa kõnesoleva katsega, erinevalt lahustunud orgaanilise süsiniku kao mõõtmisest, otse määrata lõplikku biolagunemist, kuid tulemus on respiromeetrilise katse tulemusega sarnane. Mineraliseerumise määr on järelikult lõpliku biolagunemise minimaalsest tasemest väiksem või sellega võrdne. Täielikuma pildi saamiseks lõplikust biolagunemisest (mineraliseerumine ja sidumine biomassi) tehakse katse lõpus ^{14}C faasijaotuse analüüs (vt 1. liide). Tahkete osakeste puuli seotud ^{14}C jaguneb baktermassi seotud ^{14}C-ks ja orgaanilistele tahketele osakestele sorbeerunud ^{14}C-ks.

2.3. KATSE VASTAVUS NÕUETELE

Kui standardaine ei lagune eeldatud aja jooksul (aniliini ja naatriumbensoaadi eeldatav lagunemisaeg on tavaliselt alla kahe nädala), on katse nõuetelevastavus kaheldav ja vajab tõendamist; teine võimalus on korrata katset uue veeprooviga. Käesoleva meetodi kontrollimisel seitsme Euroopa labori vahelises ISO võrdluskatses oli aniliini lagunemise kiiruskonstandi väärtus 20 °C juures pärast kohanemisfaasi vahemikus 0,3–1,7 ööpäev^{-1}, keskväärtus 0,8 ööpäev^{-1} ja standardhälve ± 0,4 ööpäev^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 ööpäeva). Ootefaas oli tavaliselt 1–7 ööpäeva. Kontrollitud veeproovides registreeriti bakterbiomassi sisalduseks 10^3–10^4 kolooniaid moodustavat üksust ühes milliliitris. Toitainerikastes Kesk-Euroopa veeproovides oli lagunemiskiirus suurem kui Põhja-Euroopa oligotroofsetes veeproovides; see võib olla tingitud kas erinevast troofsusest või erinevustest varasemas kokkupuutumises keemiliste ainetega.

Radiomärgisega ainete korral peaks kogu määramissaagis (massibilanss) katse lõpus olema 90–110 %; märgiseta ainete korral peaks algfaasi määramissaagis katse alguses olema 70–110 %. Need saagisevahemikud on esitatud siiski üksnes sihtvahemikena ja neid ei tule kasutada katse nõuetele vastavuse kriteeriumina.

▼M1

3. **KATSEPROTOKOLL**

Katseprotokollis märgitakse selgesti, kas tegemist on pelaagilise või hõljumikatsega; lisaks sellele esitatakse vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine ja standardaine (standardained):

— uuritava aine ja standardaine tavanimetused, keemilised nimetused (soovitatavalt IUPACi ja/või CASi nimetused), CASi numbrid, struktuurivalemid (radiomärgisega aine puhul näidatakse ^{14}C asukoht) ning olulised füüsikalis-keemilised omadused (vt punktid 1.5 ja 1.6);

— muundumissaaduste identifitseerimise ja mõõtmise standarditena kasutatud ainete keemilised nimetused, CASi numbrid, struktuurivalemid (radiomärgisega aine puhul näidatakse ^{14}C asukoht) ning olulised füüsikalis-keemilised omadused;

— uuritava aine ja standardaine puhtusaste (lisandid);

— märgisega kemikaalide radiokeemiline puhtusaste ja eriaktiivsus (vajaduse korral).

Pinnavesi:

Võetud veeproovi kohta esitatakse vähemalt järgmised andmed:

— proovivõtukoha asukoht ja kirjeldus, kaasa arvatud saastelugu (võimaluse korral);

— proovivõtu kuupäev ja aeg;

— toitainesisaldus (üldlämmastik, ammoonium, nitritid, nitraadid, üldfosfor, lahustunud ortofosfaat);

— proovivõtu sügavus;

— proovi väline iseloomustus (nt värvus ja hägusus);

— lahustunud ja summaarne orgaaniline süsinik;

— biokeemiline hapnikutarve;

— proovi võtmisel kohapeal määratud temperatuur ja pH;

— hapnikusisaldus või redokspotentsiaal (nõutav, kui ei ole ilmne, et tegemist on aeroobsete tingimustega);

— soolsus või juhtivus (mere- või riimvee puhul);

— hõljumisisaldus (häguse proovi puhul);

— proovivõtu asukohta käsitlev muu asjakohane teave, mis oli teada proovivõtu ajal (nt andmed jõe voolu- või merehoovuse kiiruse kohta proovi võtmise ajal või varem, naabruses esinenud suured heited ja nende laad, proovivõtule eelnenud ilmastikutingimused);

ning järgmised mittekohustuslikud andmed:

— mikroorganismide biomass (nt otse loendatud akridiinoranžiga värvunud rakkude arv või kolooniaid moodustavate üksuste arv);

▼**M1**

— anorgaaniline süsinik;

— klorofüll a kontsentratsioon, mis on vetikate biomassi kajastav spetsiifiline näitaja.

Hõljumikatse korral esitatakse lisaks veel järgmised andmed sette kohta:

— setteproovi võtmise sügavus;

— sette väline iseloomustus (värvunud, muda-, aleuriit- või liivsete);

— lõimis (jämeteralise liiva, peeneteralise liiva, aleuriidi ja savi protsent);

— hõljuvaine kuivmassi sisaldus, g/l; orgaanilise süsiniku üldsisaldus või põletuskadu, mis on orgaanilise aine sisalduse näitaja;

— pH;

— hapnikusisaldus või redokspotentsiaal (nõutav, kui ei ole ilmne, et tegemist on aeroobsete tingimustega).

Katsetingimused:

— proovivõtust katseni möödunud ajavahemik, proovi hoidmine ja ettevalmistamine, katsekuupäevad;

— lisatud uuritava aine kogus, kontsentratsioon katses ja standardaine;

— uuritava aine lisamise viis, kaasa arvatud lahusti kasutamine;

— kasutatud pinnavee ja sademe maht ning iga proovivõtukorra puhul analüüsitud osaproovi maht;

— kasutatud katsesüsteemi kirjeldus.

Kui katse ei toimunud valguse juurdepääsuta, märgitakse hajuvalgustuse tingimused;

— teave steriilsete kontrollkatsete ettevalmistamise kohta (autoklaavimise temperatuur, aeg ja kordade arv);

— inkubatsioonitemperatuur;

— analüüsimeetodid ja radiokeemilise mõõtmise meetodid, massibilansi kontrollimiseks ja faasijaotuse mõõtmiseks (kui mõõdeti) kasutatud meetodid.

— paralleelkatsete arv.

Tulemused:

— saagis protsentides (vt punkt 1.7.1);

— kasutatud analüüsimeetodite korratavus ja tundlikkus, kaasa arvatud avastamislävi ja mõõtmislävi (vt punkt 1.7.2);

▼M1

— kõik mõõtmistulemused (koos proovivõtuaegadega) ja arvutatud väärtused esitatakse tabelina ja lagunemiskõverad graafiliselt; iga uuritava kontsentratsiooni ja iga paralleelnõu jaoks esitatakse logaritmilise graafiku tõusu iseloomustav lineaarse korrelatsiooni koefitsient, hinnanguline ootefaasi kestus ning (võimaluse korral) esimest järku või pseudo-esimest järku kiiruskonstant ja vastav poollagunemisaeg (või poolestusaeg, t_{50});

— asjaomased väärtused (ootefaasi kestus, lagunemise kiiruskonstant, poollagunemisaeg või poolestusaeg, t_{50}) esitatakse üksikute paralleelkatsete tulemuste keskmisena;

— lagunemiskõvera laadi ja uuritava aine kontsentratsiooni võimaliku mõju alusel liigitatakse katsesüsteem kohanenud või kohanemata süsteemiks;

— lõpliku massibilansi kontrolli ja faasijaotuse mõõtmiste tulemused;

— mineraliseerunud ^{14}C osa ja esmase lagunemise lõpptase (kui see määrati analüüsiga);

— (vajaduse korral) lisatud ainete ja oluliste muundumissaaduste identifitseerimisandmed, molaarne kontsentratsioon ja protsent (vt punkt 1.8.9.5, esimene lõik);

— oletatav muundumistee (vajaduse korral);

— tulemuste arutelu.

4. **KIRJANDUS**

1) OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2) ISO/DIS 14592–1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3) Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4) Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6) ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7) ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8) OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

9) Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394–401.

10) Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274–283.

11) ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

1. liide

^{14}C jaotus faaside vahel

Lisaks tavalistele orgaanilise ^{14}C jääkaktiivsuse mõõtmistele määratakse meetodi kontrollimiseks ka massibilanss, mille puhul mõõdetakse eraldunud $^{14}CO_2$ otse pärast selle püüdmist absorberisse (vt 3. liide). $^{14}CO_2$ eraldumine on biolagunemise otsene tõend, kuna abiootilisel lagunemisel või muude kaomehhanismide, nagu lendumise või sorptsiooni korral seda ei esine. Kasulikku lisateavet biolagunemise kohta annab mõõtmine, kuidas summaarne orgaaniline süsinik on jaotunud lahusefaasi (lahustunud orgaanilise ^{14}C aktiivsus) ja osakestefaasi (tahkete osakestega seotud orgaanilise ^{14}C aktiivsus) vahel; tahked osakesed eraldatakse membraanfiltrimise või tsentrifuugimisega. Tahkete osakestega seotud orgaanilise ^{14}C aktiivsusesse annavad panuse mikroobide biomassile ja muudele tahketele osakestele sorbeerunud uuritav aine ja uuritavast ainest pärinev süsinik, mida on kasutatud uue rakumaterjali sünteesiks ja seotud tahkete osakestena esineva biomassi fraktsiooni. Lahustunud orgaaniline ^{14}C määratakse biolagunemise lõpus (kõveral lagunemine *vs*. aeg esineva platoo järgi).

Et valitud proovis määrata ^{14}C jääkaktiivsuse jaotus faaside vahel, filtritakse proov läbi membraanfiltri poori suurusega 0,22 või 0,45 μm, mis on valmistatud uuritavat ainet praktiliselt mitteadsorbeerivast materjalist (võib sobida polükarbonaatfilter). Kui uuritava aine sorptsioon filtrile (kontrollitakse enne katset) on nii tugev, et seda ei saa jätta arvestamata, võib filtrimise asemel kasutada suure kiirendusega tsentrifuugimist (2 000 g; 10 min).

Filtraati või tsentrifugaati käideldakse 3. liites filtrimata proovi puhul kirjeldatud viisil. Membraanfilter lahustatakse sobivas stsintillatsioonivedelikus ja aktiivsus loendatakse tavalisel viisil, kusjuures kasutatakse kas ainult välisstandardi suhte meetodil saadud kustumisparandit või proovi oksüdeerijat. Tsentrifuugimise korral resuspendeeritakse tahkete osakeste sade 1–2 ml destilleeritud vees ja asetatakse stsintillatsioonipudelisse. Tsentrifuugitopsi pestakse kaks korda 1 ml destilleeritud veega ja pesuveed lisatakse stsintillatsioonipudelisse. Vajaduse korral võib hõljumi fikseerida vedelikstsintillatsioonloendamiseks ettenähtud geeli.

▼M1

2. liide

Poolpidev meetod

Raskesti lagunevate ainete piisavaks lagundamiseks võib olla vajalik kuudepikkune inkubeerimine. Kui esmase veeproovi omaduste säilitamiseks katsehõljumit ei uuendata, ei peaks katse kestus ületama tavaliselt 60 ööpäeva. Kui uuritava aine lagunemine algab esimese 60 ööpäeva jooksul, võib katset siiski pikendada kuni 90 ööpäevani katsehõljumit uuendamata.

Mitmesuguste kaomehhanismide ning veeproovis leiduvate asendamatute toitainete ja esmaste süsiniksubstraatide ammendumise tõttu võib pika inkubatsiooniaja jooksul väheneda mikroobikoosluse mitmekesisus. Sellepärast soovitatakse aeglaselt lagunevate ainete lagunemiskiiruse nõuetekohaseks määramiseks kasutada poolpidevat katset. Kui kogemuste põhjal võib eeldada, et 20 % aine lagunemiseks on proovi vaja inkubeerida kolm kuud, tuleb katset alustada poolpidevas režiimis. Kui katset on alustatud portsrežiimis ja umbes 60 ööpäevaga ei ole nõutavat lagunemise määra saavutatud, võib hariliku portsrežiimi asendada poolpideva režiimiga. Kui on registreeritud oluline lagunemine (> 20 %), võib poolpideva režiimi peatada ja jätkata katset portsrežiimis.

Poolpideva katse puhul vahetatakse iga kahe nädala tagant umbes üks kolmandik katsehõljumi mahust värskelt võetud veega, millele on lisatud uuritavat ainet algkontsentratsioonini. Ka mittekohustusliku hõljumikatse korral lisatakse vahetusveele setet algkontsentratsioonini (0,01–1 g/l). Hõljumikatse puhul on oluline, et ka veevahetuse jooksul säiliks täielikult suspendeeritud süsteem ning tahke aine ja vee viibeajad oleksid samad, vastasel juhul läheks kaduma taotletud sarnasus homogeense, fikseeritud faasideta veesüsteemiga. Sellepärast tuleks poolpideva režiimi kasutamisel valida suspendeeritud sette kontsentratsioon pigem selle vahemiku madalamas osas.

Uuritava aine lisamine ettenähtud viisil tähendab, et katsesuspensiooni osalisel uuendamisel ei ületata uuritava aine algkontsentratsiooni ja järelikult välditakse kõrge uuritava aine kontsentratsiooni puhul sageli esinevat kohanemisfaasi. Kuna katse käigus toimub nii reinokuleerimine kui ka ammendatud toitainete ja esmaste substraadivarude täiendamine, taastatakse algne mikroobikoosluse mitmekesisus ja katset võib põhimõtteliselt pikendada lõpmatult. Poolpideva režiimi kasutamisel on oluline silmas pidada, et uuritava aine jääkkontsentratsioonis tuleb teha parandid, mis arvestavad iga veevahetusega lisatud ja eemaldatud uuritava aine koguseid. Vähesorbeeruva aine puhul ei ole vaja teha vahet lahustunud uuritava aine kontsentratsiooni ja uuritava aine üldkontsentratsiooni vahel. Ainete puhul, mille log K_{ow} < 3 (ja tegemist on neutraalse lipofiilse ühendiga), on ettenähtud tingimustes (tahke aine sisaldus 0,1–1 g/l) sorptsioon tähtsusetu (< 5 %). Seda selgitab järgmine arvutusnäide. Tahke aine sisaldus 0,1 g/l vastab süsiniku sisaldusele ligikaudu 10 mg/l (süsiniku osa, $f_C = 0{,}01$). Eeldame, et

uuritava aine log $K_{ow} = 3$,

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$,

jaotuskoefitsient $K_d = f_C \times K_{oc}$,

järelikult avaldub üldkontsentratsiooni lahustunud fraktsioon (C-vesi (C_w)/C-üld (C_t)) järgmiselt:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$.

▼M1

3. liide

$^{14}CO_2$ määramine

$^{14}CO_2$ kaudne määramine

Kui uuritav aine ei ole lenduv ega muundu lenduvateks muundumissaadusteks, on standardsete mõõtmiste korral kaudne meetod tavaliselt kõige väiksemat ajakulu nõudev ja kõige täpsem. Filtrimata 5-milliliitrised proovid pannakse lihtsalt stsintillatsioonipudelitesse. Sobiv proovi algaktiivsus on 5 000 – 10 000 lagunemist minutis (80–170 Bq) ja minimaalne algaktiivsus umbes 1 000 lagunemist minutis. Pärast 1–2 tilga kontsentreeritud H_3PO_4 või HCl lisamist keskkonna hapestamiseks pH-ni 2–3 eraldatakse CO_2. CO_2 eraldamiseks võib barboteerida õhku läbi proovi ligikaudu ½–1 tunni jooksul. Teine võimalus CO_2 eraldamiseks on loksutada proovi tugevasti 1–2 tundi (mikroplaatloksutil) või loksutada mõõdukalt hommikuni. CO_2 eraldumise täielikkust on vaja kontrollida (selleks pikendatakse barboteerimise või loksutamise aega). Seejärel lisatakse veeproovide puhul loendamiseks sobiv stsintillatsioonivedelik, proov homogeniseeritakse keerissegistil ja määratakse radioaktiivsus vedelikstsintillatsiooniloenduse abil, millest lahutatakse pimekatses leitud taustaktiivsus (F_B). Kui katsevesi ei ole väga tugevasti värvunud ja tahkete osakeste sisaldus ei ole ülemäära suur, on kustumine kõigi proovide puhul tavaliselt ühetaoline ja piisab välisstandardi abil leitud kustumisparandist. Kui katsevesi on tugevasti värvunud, võib kustumisparandi leidmiseks olla vajalik sisestandardi lisamine. Suure tahkete osakeste sisalduse korral võib homogeense lahuse või geeli saamine olla võimatu või kustumine võib erinevates proovides olla väga erinev. Sellisel juhul võib kasutada järgmist suspensioonide uurimiseks mõeldud loendusmeetodit. $^{14}CO_2$ kaudseks mõõtmiseks hõljumikatses eraldatakse faasid, tsentrifuugides 10 ml katsevee/katsehõljumi homogeenset proovi sobival kiirendusel (40 000 m/s^2, 15 minutit). Veefaasi käideldakse eespool kirjeldatud viisil. ^{14}C aktiivsuse määramiseks tahkete osakeste faasis (tahkete osakestega seotud orgaanilise $^{14}CO_2$ aktiivsus) resuspendeeritakse sade väikeses koguses destilleeritud vees, kantakse suspensioon üle stsintillatsioonipudelitesse ja lisatakse geeli moodustav stsintillatsioonivedelik (selleks on müügil spetsiaalsed stsintillatsioonivedelikud). Olenevalt tahkete osakeste laadist (nt orgaanilise aine sisaldusest) võib proovi digereerida koesolubilisaatoriga hommikuni, homogeniseerida keerissegistil ja lisada seejärel stsintillatsioonivedelik. Tahkete osakestega seotud orgaanilise $^{14}CO_2$ aktiivsuse määramiseks võib sademe ka põletada hapniku liias proovi oksüdeerija juuresolekul. Sellisel juhul tuleb alati kasutada sisestandardit, kusjuures kustumisparandite arvestamiseks võib olla vaja lisada sisestandard igale proovile eraldi.

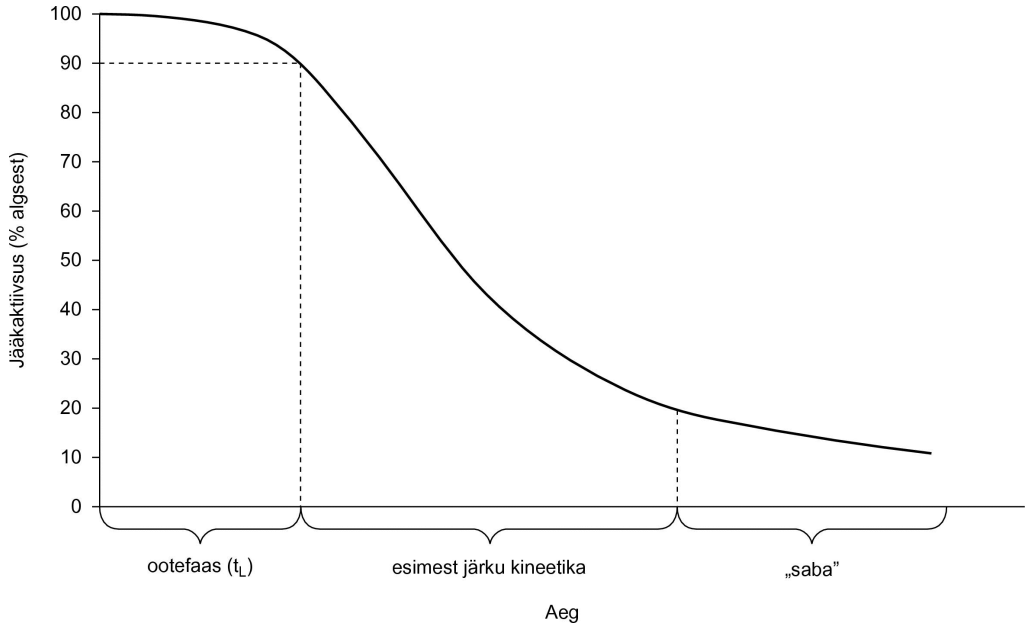
$^{14}CO_2$ otsemääramine

Kui eraldunud $^{14}CO_2$ määratakse otse, tuleb katseks ette valmistada rohkem nõusid ja võtta iga mõõtepunkti puhul prooviks ühe katsenõu kogu sisu, hapestada see pH-ni 2–3 ja koguda $^{14}CO_2$ siseabsorberisse (pannakse igasse katsenõusse katse alguses) või välisabsorberisse. Absorbeeriva keskkonnana võib kasutada leelist (1 N NaOH lahus või NaOH graanulid), etanoolamiini või mõnda etanoolamiini baasil valmistatud müügil olevat absorbenti. $^{14}CO_2$ otsemõõtmise korral peavad katsenõud olema suletud butüülkummist septumitega.

▼**M1**

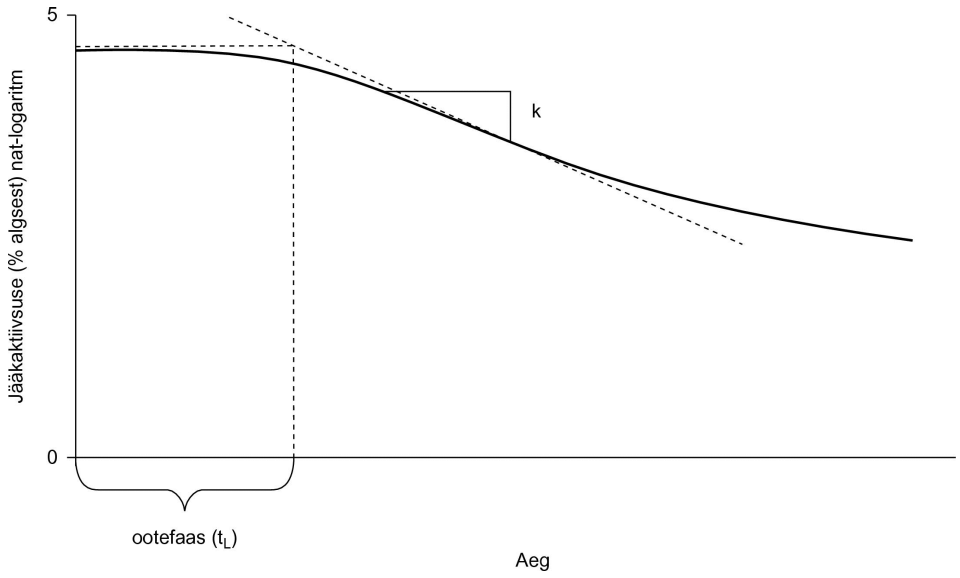
Joonis 1a

Naturaalses teljestikus (jääkaktiivsus *vs.* aeg) esitatud katseandmete näide



Joonis 1b

Poollogaritmilises teljestikus (naturaallogaritm jääkaktiivsusest *vs.* aeg) esitatud katseandmete näide



▼M6

C.26. PEREKONNA *LEMNA* TAIMEDE KASVU PIDURDUMISE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 221 (2006). Meetod on ette nähtud kemikaalide mürgisuse hindamiseks perekonna *Lemna* (lemmel) mageveetaimedel. See põhineb olemasolevatel meetoditel (1, 2, 3, 4, 5, 6), kuid hõlmab neis tehtud muudatusi, mis kajastavad viimaste teadusuuringute ja mitut põhiküsimust käsitleva arutelu tulemusi. Käesolev katsemeetod on valideeritud rahvusvahelise võrdlusuuringuga (7).

2. Meetodis kirjeldatakse mürgisuse hindamist liikidel *Lemna gibba* ja *Lemna minor*, mida on põhjalikult uuritud ja mida kasutatakse eespool osutatud standardite kohaste katseobjektidena. Suurest fenotüübilisest varieeruvusest tulenevalt on *Lemna* liikide taksonoomia keeruline. Ehkki *Lemna* puhul võib täheldada geneetilist varieeruvust taimede tundlikkuses mürgistele kemikaalidele, ei ole selle varieeruvuse kohta praegu piisavalt andmeid, et soovitada kasutada käesoleva meetodi puhul mõnda konkreetset klooni. Tuleks silmas pidada, et katses ei kasutata puhaskultuuri, kuid eri katseetappides võetakse meetmeid muude organismidega saastumise minimeerimiseks.

3. Meetodis kirjeldatakse katse üksikasju uuendatava katselahuse (poolstaatiline või läbivoolurežiim) ja mitteuuendatava katselahuse (staatiline režiim) kasutamisel. Olenevalt katse eesmärgist ja regulatiivsetest nõuetest on soovitatav kaaluda poolstaatilise või läbivoolurežiimi kasutamist näiteks selliste kemikaalide puhul, mis kaovad lahusest kiiresti lendumise, fotolagunemise, sadenemise või biolagunemise tõttu. Täiendavad juhised on esitatud allikas 8.

4. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

5. Perekonna *Lemna* taimede eksponentsiaalselt kasvavatel monokultuuridel lastakse seitsme ööpäeva jooksul kokku puutuda eri kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaaliga. Katse eesmärk on kirjeldada valitud mõõdetava muutuja alusel kvantitatiivselt kemikaali mõju vegetatiivsele kasvule nimetatud perioodi jooksul. Peamine mõõdetav muutuja on tallusjate võsude arv. Kuna mõni kemikaal võib mõjutada muid mõõdetavaid muutujaid palju rohkem kui tallusjate võsude arvu, hinnatakse peale selle veel vähemalt ühte mõõdetavat muutujat (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või märgmass). Kemikaali mõju kvantitatiivseks hindamiseks võrreldakse kasvu katselahuses kasvuga kontrollrühmas ning tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures kasv pidurdub teatud kindla protsendi x (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul EC_x (nt EC_{50}).

6. Katse lõppnäitaja on kasvu pidurdumine, kusjuures kasvu väljendatakse mõõdetava muutuja logaritmitud väärtuse suurenemisena kokkupuuteaja jooksul (keskmine kasvu erikiirus). Katselahuste seerias määratud keskmiste kasvu erikiiruste põhjal tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille puhul kasvukiirus väheneb teatud kindla protsendi x (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul E_rC_x (nt E_rC_{50}).

7. Käesoleva meetodi puhul kasutatakse süsteemi vastust iseloomustava muutujana ka saagist, mille määramine võib olla vajalik mõnes riigis kehtivate regulatiivsete erinõuete täitmiseks. Saagis on määratletud kui kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetavate muutujate väärtuste vahe. Katselahuste seerias määratud saagiste põhjal arvutatakse kontsentratsioon, mille puhul saagis väheneb teatud kindla protsendi x (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul E_yC_x (nt E_yC_{50}).

▼**M6**

8. Peale selle võib statistiliselt kindlaks teha vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC).

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

9. Analüüsimeetod uuritava kemikaali sisalduse määramiseks katsesöötmes peaks olema piisava tundlikkusega.

10. Katsetingimuste kindlaksmääramiseks võib uuritava kemikaali kohta olla kasulik teada muu hulgas järgmisi andmeid: struktuurivalem, puhtus, lahustuvus vees, püsivus vees ja valguse käes, pK_a, K_{ow}, aururõhk ja biolagunduvus. Vees lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas uuritava kemikaali märkimisväärne kadu katse ajal on tõenäoline. See aitab kindlaks teha, kas sellise kao ärahoidmiseks tuleks võtta konkreetseid meetmeid. Kui puuduvad kindlad andmed uuritava kemikaali lahustuvuse ja püsivuse kohta, soovitatakse hinnata neid omadusi katses kasutatavates tingimustes, st samas söötmes ning sama temperatuuri ja valgusrežiimi juures.

11. Kui katsesöötme pH hoidmine on eriti tähtis, nt kui uuritakse metalle või kergesti hüdrolüüsuvaid kemikaale, soovitatakse lisada söötmese puhverainet (vt punkt 21). Täiendavad juhised selliste kemikaalide mõju hindamiseks, mille füüsikalis-keemilised omadused raskendavad nende uurimist, on esitatud allikas 8.

KATSE NÕUETEKOHASUS

12. Katse on nõuetekohane, kui tallusjate võsude arvu kahekordistumise aeg kontrollrühmas on lühem kui 2,5 ööpäeva (60 tundi), mis vastab võsude arvu umbes seitsmekordsele suurenemisele seitsme ööpäeva jooksul ja keskmisele kasvu erikiirusele 0,275 ööpäeva kohta. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud söötmete ja katsetingimuste kasutamisel on see kriteerium staatilise katserežiimi puhul täidetav (5). Seda kriteeriumi on eeldatavalt võimalik täita ka poolstaatilise ja läbivoolurežiimi puhul. Kahekordistumisaeg arvutatakse punkti 49 kohaselt.

VÕRDLUSKEMIKAAL

13. Katsemeetodi kontrollimiseks võib kasutada rahvusvahelises võrdlusuuringus (7) kasutatud võrdluskemikaale, näiteks 3,5-diklorofenooli. Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas või kui katseid tehakse harvem, siis uuritava kemikaali mürgisuse määramisega samaaegselt.

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

14. Kõik katsesöötmega kokku puutuvad seadmed peaksid olema klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Kultuuride kasvatamiseks ja katseteks kasutatavad klaasnõud peaksid olema steriilsed ja katsesöötmesse leostuda võivatest keemilistest saasteainetest puhastatud. Katsenõud peaksid olema piisavalt laiad, et kontrollnõudes kasvavad eri kolooniate tallusjad võsud ei ulatuks katse lõpus üksteise peale. Ei ole tähtis, kas juured puudutavad

▼M6

katsenõu põhja, kuid on soovitatav, et lahuse sügavus igas nõus oleks vähemalt 20 mm ja lahuse maht vähemalt 100 ml. Kui need nõuded on täidetud, ei ole valitud katsenõu tüüp eriti oluline. Sobivaks on osutunud nii nõuetekohaste mõõtmetega keeduklaasid, kristalliseerimisnõud kui ka klaasist Petri tassid. Katsenõud peavad olema kaetud, et vähendada aurumist ja juhuslikku saastumist, kuid samal ajal peab olema tagatud vajalik õhuvahetus. Sobivad katsenõud ja eriti nende katted ei tohi varjata valgust ega muuta selle spektrit.

15. Kultuure ja katsenõusid ei tohiks hoida samas kohas. Seepärast on kõige parem kasutada eraldi kasvukambreid, inkubaatoreid või ruume. Valgustustihedus ja temperatuur peavad olema reguleeritavad ja neid hoitakse konstantsena (vt punktid 35–36).

Katseorganism

16. Käesoleva meetodi kohases katses kasutatakse katseorganismina lemmelt *Lemna gibba* või *Lemna minor*. Mürgisuse hindamise katsetes kasutatud lemleliikide lühikirjeldus on esitatud 2. liites. Taimne materjal võib pärineda kultuuride kollektsioonist, teisest laborist või loodusest. Loodusest kogutud taimi tuleks enne kasutamist kultiveerida vähemalt kaheksa nädalat katses kasutatavas söötmes. Loodusliku lähtekultuuri kogumiskohas ei tohi esineda ilmseid saasteallikaid. Teisest laborist või kultuuride kollektsioonist saadud taimi tuleks enne kasutamist kultiveerida samal viisil vähemalt kolm nädalat. Taimse materjali päritolu ning katses kasutatud liik ja kloon (kui see on teada) tuleks alati märkida katseprotokolli.

17. Tuleks kasutada monokultuure, mis ei ole nähtavalt saastunud muude organismide, näiteks vetikate või algloomadega. Lemle *L. minor* terved taimed moodustavad 2–5 tallusjast võsust koosneva koloonia; *L. gibba* tervete taimede koloonia võib koosneda kuni seitsmest tallusjast võsust.

18. Katses kasutatavate taimede kvaliteet ja ühetaolisus mõjutavad märkimisväärselt katsetulemust ning seepärast tuleks taimi hoolikalt valida. Tuleks kasutada kiirelt kasvavaid noori taimi, millel pole nähtavaid kahjustusi ega värvimuutusi (kloroos). Kvaliteetses kultuuris on palju vähemalt kahest tallusjast võsust koosnevaid kolooniaid. Ühekaupa esinevate tallusjate võsude rohkus osutab keskkonnastressile, nt toitainevaegusele; sellisest kultuurist saadud taimset materjali ei tohiks katses kasutada.

Kultiveerimine

19. Kultuuride hooldamissageduse vähendamiseks (nt kui teatava aja jooksul ei kavandata katseid lemlega) võib kultuure hoida vähendatud valgustustiheduse ja madalama temperatuuri (4–10 °C) juures. Kultiveerimist kirjeldatakse üksikasjalikult 3. liites. Vetikate või muude organismidega saastumise tunnuste ilmnemisel võib olla vaja lemle tallusjate võsude osaproov pindsteriliseerida ja seejärel värskesse söötmesse üle viia (vt 3. liide). Ülejäänud saastunud kultuur tuleks sellisel juhul kõrvaldada.

20. Vähemalt seitse päeva enne katset viiakse piisav arv kolooniaid aseptiliselt värskesse steriilsesse söötmesse ja kolooniaid kasvatatakse katsetingimustes 7–10 ööpäeva.

Katsesööde

21. Liikide *Lemna minor* ja *Lemna gibba* puhul soovitatakse kasutada allpool kirjeldatud eri söötmeid. Tuleks hoolikalt kaaluda, kas lisada katsesöötmesse pH puhvrit (liigi *L. minor* puhul MOPS (4-morfoliinpropaansulfoonhape, CASi nr 1132-61-2) ja *L. gibba* puhul $NaHCO_3$), kui on kahtlus, et see võib reageerida uuritava kemikaaliga ja mõjutada kemikaali mürgisuse avaldumist. Võib kasutada ka Steinbergi söödet (9), kui järgitakse nõuetele vastavuse kriteeriume.

▼M6

22. Liigi *L. minor* taimede kultiveerimiseks ja nendega katsete tegemiseks soovitatakse kasutada Rootsi Standardiinstituudi (SIS) lemlesöödet modifitseeritud kujul. Selle söötme koostis on esitatud 4. liites.

23. *L. gibba* kultiveerimiseks ja sellega katsete tegemiseks soovitatakse kasutada 4. liites kirjeldatud söödet 20X-AAP.

24. Liigi *L. minor* puhul ja ka *L. gibba* puhul võib nõuetele vastavuse kriteeriumide järgimise korral kasutada ka 4. liites kirjeldatud Steinbergi söödet.

Katselahused

25. Katselahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Uuritava kemikaali põhilahuse valmistamiseks lahustatakse kemikaal tavaliselt söötmes.

26. Üldjuhul ei tohiks uuritava kemikaali suurim kasutatav kontsentratsioon ületada kemikaali vees lahustuvust katsetingimustes. Sama ajal tuleks silmas pidada, et lemleliikide taimed ujuvad pinnal ja võivad kokku puutuda ka vee ja õhu piirpinnale koguneva kemikaaliga (nt vees raskesti lahustuv, hüdrofoobne või pindaktiivne kemikaal). Sellisel juhul puutuvad taimed kokku ka muu kui lahuses oleva materjaliga ning olenevalt uuritava kemikaali omadustest võib kemikaali kokkupuutekontsentratsioon olla suurem kui selle vees lahustuvus. Vees raskesti lahustuva kemikaali puhul võib olla vaja kasutada selle kemikaali kontsentreeritud põhilahuse või dispersiooni valmistamiseks orgaanilist lahustit või dispergeerivat ainet, et hõlbustada uuritava kemikaali täpse koguse lisamist katsesöötmesse ja soodustada kemikaali lahustumist või dispergeerumist. Tuleks teha kõik selleks, et selliseid aineid ei oleks vaja kasutada. Lisatav lahusti või dispergeeriv aine ei tohiks olla fütotoksiline. Tavaliselt kasutatavad lahustid, mis kuni kontsentratsioonini 100 µl/l ei ole fütotoksilised, on näiteks atsetoon ja dimetüülformamiid. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamisel peaks selle lõppsisaldus olema võimalikult väike (≤ 100 µl/l) ja tuleks märkida katseprotokolli ning kõigi katse- ja kontrollkultuuride puhul tuleks kasutada lahusti või dispergeeriva aine ühesugust kontsentratsiooni. Täiendavad juhised dispergeeriva aine kasutamise kohta on esitatud allikas 8.

Katse- ja kontrollrühmad

27. Uuritava kemikaali sobivate kontsentratsioonide valimine on hõlpsam, kui kemikaali mürgisus lemlele on eelnevalt näiteks kontsentratsioonivahemiku leidmise katsega kindlaks tehtud. Mürgisuse hindamise lõplikus katses tuleks üldjuhul kasutada vähemalt viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Kasutatavate kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks üldjuhul olla suurem kui 3,2, kuid kontsentratsiooni ja mõju vahelise nõrga sõltuvuse puhul võib siiski kasutada suuremat tegurit. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleks seda põhjendada. Uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada vähemalt kolme paralleelkultuuri.

28. Kasutatavate kontsentratsioonide valimisel kontsentratsioonivahemiku leidmise katse ja/või mürgisuse hindamise lõpliku katse jaoks tuleks arvestada järgmist.

— EC_x määramisel peaks EC_x väärtus jääma kasutatavasse kontsentratsioonivahemikku, et tagada tulemuste piisav usaldusväärsus. Näiteks peaks EC_{50} määramisel suurim kasutatav kontsentratsioon olema suurem kui EC_{50} väärtus. Kui EC_{50} väärtus jääb kasutatavast kontsentratsioonivahemikust väljapoole, on asjaomane usaldusvahemik lai ja lähendatud mudeli sobivust katseandmetega ei pruugi olla võimalik statistiliselt hinnata.

— Kui eesmärk on leida LOEC või NOEC, peaks väikseim kasutatav kontsentratsioon olema piisavalt väike, et kasv ei oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Peale selle peaks suurim kasutatav kontsentratsioon olema piisavalt suur, et kasv oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Vastasel juhul

▼M6

tuleb katset korrata, kasutades teistsugust kontsentratsioonivahemikku (kui suurim kasutatav kontsentratsioon ei ole juba võrdne lahustuvuse piirkontsentratsiooniga või suurima nõutava kontsentratsiooniga, näiteks 100 mgl/1).

29. Igas katses kasutatakse ka kontrollkultuure, mille puhul sööde, tallusjate võsude ja kolooniate arv, keskkonnatingimused ja katsemeetodid on samad kui uuritava kemikaaliga kultuuride puhul, kuid mis ei sisalda uuritavat kemikaali. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamise korral tuleks lisaks valmistada kontrollkultuur, milles lahusti või dispergeeriva aine kontsentratsioon on sama kui uuritavat kemikaali sisaldavates nõudes. Paralleelsete kontrollnõude ja vajaduse korral lahustiga kontrollnõude arv peab olema vähemalt võrdne uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul kasutatavate nõude arvuga ning soovitatavalt sellest kaks korda suurem.

30. Kui ei ole vaja määrata NOEC väärtust, võib katseplaani muuta nii, et suurendatakse uuritava kemikaali kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelkultuuride arvu iga kontsentratsiooni kohta. Paralleelseid kontrollkultuure peab siiski olema vähemalt kolm.

Kokkupuude

31. Inokulum-kultuurist viiakse 2–4 nähtavast tallusjast võsust koosnevad kolooniad aseptilistes tingimustes juhuvaliku alusel üle katsenõudesse. Igas katsenõus peaks olema kokku 9–12 tallusjat võsu. Tallusjate võsude ja kolooniate arv peaks kõikides katsenõudes olema võrdne. Käesoleva meetodi rakendamisel saadud kogemustest ja võrdlusuuringu andmetest nähtub, et kui kasutada iga kontsentratsiooni kohta kolme paralleelkultuuri, millest igaühes on algselt 9–12 tallusjat võsu, on see piisav, et teha kindlaks eri kontsentratsioonidel täheldatav kasvukiiruse muutumine umbes 4–7 % võrra (saagise vähenemine 10–15 % võrra) (7).

32. Katsenõude paigutus inkubaatoris peab olema juhuslik, et vähendada asukohast tingitud temperatuuri ja valgustustiheduse erinevuste mõju. Samuti on vaja katsenõud mõõtmiste tegemise ajal või suurema sagedusega kas kindla skeemi alusel või juhuslikult ümber paigutada.

33. Kui püsivuse määramise eelkatsest nähtub, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni ei ole võimalik katse vältel (7 ööpäeva jooksul) püsivana hoida, st kemikaali mõõdetud sisaldus langeb alla 80 % mõõdetud algsisaldusest, soovitatakse kasutada poolstaatilist katserežiimi. Sel juhul tuleks kolooniad katse jooksul vähemalt kahel korral (nt kolmandal ja viiendal katsepäeval) üle viia värskelt valmistatud katse- ja kontroll-lahustesse. Värskesse söötmesse üleviimise sagedus sõltub uuritavast kemikaalist; väga ebapüsiva või lenduva kemikaali puhul võib selle sisalduse peaaegu püsivana hoidmiseks olla vaja tagada sagedasem üleviimine värskesse söötmesse. Mõnel juhul võib olla vaja kasutada läbivoolumeetodit (8, 10).

34. Käesolevas katsemeetodis ei käsitleta kokkupuudet taimelehtedele pritsimise teel; selle meetodi puhul vt allikas 11.

Inkubeerimistingimused

35. Tuleks kasutada päevavalguse spektriga või külmvalget pidevat fluorestsentsvalgust, mille intensiivsus jääb vahemikku 85–135 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$ (vastab 6 500–10 000 luksile), mõõdetuna fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus 400–700 nm punktides, mis on valgusallikast sama kaugel kui *Lemna* tallusjad võsud. Valgustustihedus ei tohiks katsepinna üheski punktis erineda valitud väärtusest üle 15 %. Valgustustiheduse mõõdetav väärtus sõltub

▼M6

mõõtmismeetodist ja eelkõige anduri tüübist. Ühest suunast saabuvale valgusele reageeriva anduri asemel soovitatakse kasutada kerakujulist andurit, mis reageerib nii ülalt- kui ka altpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele, või koosinusandurit, mis reageerib ülaltpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele; sellise anduriga saadakse käesolevas meetodis kirjeldatud mitmepunktilise valgusallika puhul suuremad väärtused.

36. Temperatuur katsenõudes peaks olema 24 ± 2 °C. Kontrollsöötme pH ei tohiks katse ajal tõusta rohkem kui 1,5 ühikut. Kui pH tõuseb üle 1,5 ühiku, ei loeta katset siiski nõuetele mittevastavaks, kui on võimalik tõendada, et nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud. Erijuhul, nt ebapüsiva kemikaali või metalli mõju uurimisel tuleb pH muutumisele pöörata erilist tähelepanu. Täiendavad juhised on esitatud allikas 8.

Kestus

37. Katse lõpetatakse, kui taimede viimisest katsenõudesse on möödunud seitse ööpäeva.

Mõõtmised ja analüüsid

38. Katse alguses loendatakse ja registreeritakse tallusjate võsude arv katsenõudes, jälgides, et arvesse võetakse kõik väljaulatuvad selgesti nähtavad tallusjad võsud. Normaalse või ebanormaalse välimusega tallusjate võsude arv määratakse katse alguses, vähemalt iga kolme ööpäeva järel (st vähemalt kaks korda 7-päevase katse jooksul) ja katse lõpus. Tuleks registreerida muutused taimede arengus, nt tallusjate võsude suuruses ja välimuses, nekroosi, kloroosi või puhetumise ilmingud, kolooniate lagunemine või ujuvuse vähenemine ning muutused juurte pikkuses ja välimuses. Samuti tuleks registreerida olulised muutused katsesöötmes (nt lahustumatu aine esinemine, vetikate kasv katsenõus).

39. Lisaks tallusjate võsude arvu määramisele katse jooksul hinnatakse ka uuritava kemikaali mõju ühele või mitmele järgmistest mõõdetavatest muutujatest:

i) tallusjate võsude üldpindala,

ii) kuivmass,

iii) märgmass.

40. Tallusjate võsude üldpindala määramise eelis on asjaolu, et seda saab teha igas katse- ja kontrollnõus katse alguses, kestel ja lõpus. Kuiv- või märgmass tuleks määrata katse alguses inokulum-kultuuri representatiivse proovi alusel ning katse lõpus igast katse- ja kontrollnõust saadud taimse materjali alusel. Kui tallusjate võsude üldpindala ei mõõdeta, eelistatakse märgmassi määramisele kuivmassi määramist.

41. Tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi ja märgmassi võib määrata järgmiselt.

i) *Tallusjate võsude üldpindala*: kõigi kolooniate tallusjate võsude üldpindala võib määrata pildianalüüsi abil. Katsenõu ja taimede silueti võib jäädvustada videokaameraga (nt asetades nõu valguskastile) ja saadud kujutise digiteerida. Seejärel võib määrata tallusjate võsude üldpindala katsenõus, kasutades kalibreerimiseks teadaoleva pindalaga tasapinnalisi kujundeid. Tuleks jälgida, et katsenõu servast tingitud interferents ei segaks määramist. Teine, töömahukam meetod on teha katsenõust ja taimedest fotokoopia, lõigata välja kolooniate siluett ja määrata kolooniate pindala lehepindala analüsaatori või millimeetripaberi abil. Võib kasutada ka muid määramismeetodeid (nt kolooniate silueti pindalale ja pindalaühikule vastavate paberi kaalude suhte määramine).

▼**M6**

ii) *Kuivmass*: igast katsenõust kogutakse kõik kolooniad ja neid loputatakse destilleeritud või deioniseeritud veega. Kolooniatelt eemaldatakse kuivatuspaberiga liigne vesi ja seejärel kuivatatakse neid 60 °C juures, kuni nende kaal enam ei muutu. Kuivmassi määramisel võetakse arvesse kõik juuretükid. Kuivmassi väljendatakse täpsusega vähemalt 0,1 mg.

iii) *Märgmass*: kõik kolooniad viiakse eelnevalt kaalutud polüstüreenist (või muust inertsest materjalist) katseklaasidesse, mille ümaras põhjas on väikesed avad läbimõõduga 1 mm. Katseklaase tsentrifuugitakse 10 minutit toatemperatuuril kiirusel 3 000 pööret minutis. Sel viisil kuivatatud kolooniaid sisaldavad katseklaasid kaalutakse uuesti ning märgmassi leidmiseks lahutatakse saadud tulemusest tühja katseklaasi mass.

Mõõtmiste ja analüüside sagedus

42. Staatilise katserežiimi puhul tuleks mõõta pH igas katsenõus katse alguses ja lõpus. Poolstaatilise katserežiimi puhul tuleks mõõta värske katselahuse pH enne iga lahusevahetust ja määrata ka iga äratarvitatud lahuse pH.

43. Valgustustihedust tuleks mõõta kasvukambri, inkubaatori või ruumi punktides, mis on valgusallikast samal kaugusel kui *Lemna* tallusjad võsud. Valgustustihedust tuleks katse jooksul mõõta vähemalt üks kord. Söötme temperatuur kasvukambris, inkubaatoris või ruumis samades tingimustes hoitavas jäljendusnõus tuleks registreerida vähemalt üks kord päevas.

44. Uuritava kemikaali sisaldus määratakse katse ajal sobiva ajavahemiku tagant. Staatilise katse puhul tuleb uuritava kemikaali sisaldus määrata vähemalt katse alguses ja lõpus.

45. Poolstaatilise katse puhul, kus uuritava kemikaali sisaldus ei püsi eeldatavalt 20 % piires nominaalväärtusest, tuleb selle sisaldus määrata kõigis värskelt valmistatud katselahustes ja samades lahustes nende väljavahetamise ajal (vt punkt 33). Kui uuritava kemikaali mõõdetud algsisaldus erineb nominaalväärtusest enam kui 20 % võrra, kuid on olemas piisavad tõendid selle kohta, et algsisaldus on korratav ja püsiv (st jääb vahemikku 80–120 % algsisaldusest), võib kemikaali sisalduse määrata ainult suurimal ja väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil. Kõigil juhtudel on uuritava kemikaali sisaldus igal katses kasutataval kontsentratsioonil vaja enne katselahuse väljavahetamist määrata ainult ühes paralleelkultuuri nõus (või paralleelkultuuridest moodustatud koondproovis).

46. Läbivoolukatse puhul kasutatakse sama proovivõturežiimi kui poolstaatilises katses, sealhulgas määramist katse alguses, kestel ja lõpus, kuid sel juhul ei ole äratarvitatud lahuse analüüsimine asjakohane. Sellises katses tuleks iga päev kontrollida lahjenduslahuse ja uuritava kemikaali või uuritavat kemikaali sisaldava põhilahuse voolukiirust.

47. Kui on tõendatud, et uuritava kemikaali sisaldus ei kõigu katse vältel nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtusega võrreldes rohkem kui ± 20 %, võib tulemuste analüüsimisel võtta aluseks nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtuse. Kui kõrvalekalle sisalduse nominaalväärtusest või mõõdetud algväärtusest on suurem kui ± 20 %, tuleks tulemuste analüüsimisel võtta aluseks katse vältel esinevate väärtuste geomeetriline keskmine või mõni uuritava kemikaali sisalduse vähenemist kirjeldav mudel (8).

▼M6

Piirsisalduskatse

48. Teatavatel juhtudel, näiteks kui eelkatsest selgub, et uuritav kemikaal ei avalda kontsentratsioonil kuni 100 mg/l või katsesöötmes lahustuvuse piirkontsentratsioonil (olenevalt sellest, kumb on väiksem) mürgist mõju, võib teha piirsisalduskatse, milles võrreldakse kasvu kontrollrühmas ja ühes katserühmas, kus kemikaal esineb kontsentratsioonis 100 mg/l või lahustuvuse piirkontsentratsioonis. Piirsisalduskatse tegemisel soovitatakse tungivalt määrata ka kokkupuutekontsentratsioon. Piirsisalduskatse puhul kohaldatakse kõiki eespool kirjeldatud katsetingimusi ja nõuetele vastavuse kriteeriume; ainsa erandina nähakse ette, et uuritava kemikaaliga paralleelkultuure peaks olema kaks korda rohkem. Kasvu analüüsimiseks kontroll- ja katserühmas võib keskväärtusi võrrelda statistilise testi (nt Studenti t-testi) abil.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tallusjate võsude arvu kahekordistumise aeg

49. Tallusjate võsude arvu kahekordistumise aja T_d leidmiseks ja katse nõuetele vastavuse sellekohase kriteeriumi täitmise kindlakstegemiseks (punkt 12) kasutatakse kontrollkultuuridest saadud andmeid ja järgmist valemit:

$$T_d = \ln 2/\mu,$$

kus μ on punktides 54–55 kirjeldatud viisil määratud keskmine kasvu erikiirus.

Uuritavad muutujad

50. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju *Lemna* vegetatiivsele kasvule. Kuna eelistused ja regulatiivsed vajadused eri jurisdiktsioonides on erinevad, kirjeldatakse käesolevas katsemeetodis kahte uuritavat muutujat. Et tagada katsetulemuste vastuvõetavus kõikides jurisdiktsioonides, tuleks vaadeldava mõju hindamisel kasutada mõlemat allpool kirjeldatud muutujat (a ja b).

a) *Keskmine kasvu erikiirus*: see uuritav muutuja arvutatakse lähtuvalt tallusjate võsude arvu logaritmi ja veel ühe uuritava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) logaritmitud väärtuse ööpäevasest muutusest kontrollkultuurides ja igas uuritava kemikaaliga rühmas. Seda nimetatakse mõnikord ka suhteliseks kasvukiiruseks (12).

b) *Saagis*: see uuritav muutuja arvutatakse lähtuvalt katse lõpuks toimunud tallusjate võsude arvu ja veel ühe uuritava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) väärtuse muutusest kontrollkultuurides ja igas uuritava kemikaaliga rühmas.

51. Tuleks silmas pidada, et nende kahe uuritava muutuja abil arvutatud mürgisuse väärtused ei ole võrreldavad, ning seda erinevust tuleb katsetulemuste kasutamisel arvesse võtta. Käesolevas katsemeetodis sätestatud tingimuste kohase katse puhul on keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad EC_x väärtused (E_rC_x) üldjuhul suuremad kui saagisel põhinevad väärtused (E_yC_x), kuna asjaomaste lähenemisviiside matemaatiline alus on erinev. Seda erinevust ei tohiks tõlgendada kahe kõnealuse uuritava muutuja tundlikkuse erinevusena; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad. Keskmise kasvu erikiiruse määratlus põhineb lemle üldisel piiramata eksponentsiaalsel kasvul kultuuris, kusjuures mürgisust hinnatakse kasvukiirusele avalduva mõju alusel ja see ei olene kontrollkultuuri absoluutsest kasvu erikiirusest,

▼M6

kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera tõusust ega katse kestusest. Kui uuritav muutuja on aga saagis, sõltuvad tulemused kõikidest eespool nimetatud lisamuutujatest. E_yC_x väärtus sõltub katses kasutatud lemleliigi kasvu erikiirusest ja maksimaalsest kasvu erikiirusest, mis võib eri lemleliikidel ja isegi sama liigi eri kloonidel olla erinev. Seda uuritavat muutujat ei tohiks kasutada, kui võrreldakse lemleliikide või eri kloonide tundlikkust mürgiste kemikaalide suhtes. Ehkki keskmise kasvu erikiiruse kasutamine mürgisuse hindamiseks on teaduslikult paremini põhjendatud, käsitletakse käesolevas katsemeetodis mõnes jurisdiktsioonis kehtivate regulatiivsete nõuete järgimise võimaldamiseks ka saagisel põhinevat mürgisuse hindamist.

52. Mürgisuse hindamisel tuleks lähtuda tallusjate võsude arvust ja veel ühest mõõdetavast muutujast (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või märgmass), sest mõned kemikaalid võivad mõjutada muid mõõdetavaid muutujaid palju enam kui tallusjate võsude arvu. Ainult tallusjate võsude arvu kasutamisel jääks selline mõju avastamata.

53. Tallusjate võsude arv ja täiendavalt määratud mõõdetava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) väärtus kantakse iga mõõtmise puhul koos uuritava kemikaali kontsentratsiooni väärtusega tabelisse. Järgneval andmeanalüüsil, mille eesmärk on leida LOEC, NOEC või EC_x, kasutatakse igast üksikust paralleelkultuurist saadud väärtusi, mitte katserühma kohta arvutatud keskmisi väärtusi.

Keskmine kasvu erikiirus

54. Iga kontrollkultuuri ja uuritava kemikaaliga kultuuri puhul arvutatakse teatava ajavahemiku keskmine kasvu erikiirus kasvu iseloomustavate muutujate – tallusjate võsude arvu ja veel ühe mõõdetava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) – logaritmitud väärtuse suurenemise alusel järgmise valemi abil:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t},$$

kus

— μ_{i-j} on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul i–j,

— N_i on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel i,

— N_j on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel j,

— t on ajavahemik i–j.

Kontrollrühma ja iga katserühma puhul arvutatakse kasvukiiruse keskmine väärtus ja tulemuste hajuvus.

55. Keskmine kasvu erikiirus tuleks arvutada kogu katseaja kohta (eespool esitatud valemis tähistab katse algust ajahetk i ja katse lõppu ajahetk j). Kontrollrühma ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse keskmise kasvu erikiiruse keskväärtus ja tulemuste hajuvus. Peale selle hinnatakse kasvukiirust ka ajavahemike kaupa, näiteks logaritmitud kasvukõverate uurimise teel, et hinnata uuritava kemikaali mõju kokkupuuteaja jooksul. Ajavahemike kaupa arvutatud kasvukiiruste ja keskmise kasvukiiruse vahelised olulised erinevused osutavad pidevast eksponentsiaalsest kasvust kõrvalekaldumisele ning sel juhul on vaja kasvukõveraid üksikasjalikult uurida. Vastavalt konservatiivsele lähenemisviisile tuleks sel juhul võrrelda uuritava kemikaaliga kultuurides kasvu maksimaalse pidurdumiseni kulunud aja jooksul täheldatud kasvu erikiirust samal ajavahemikul kontrollkultuurides täheldatud kasvu erikiirusega.

56. Iga katses kasutatava kontsentratsiooni (katserühma) puhul arvutatakse kasvukiiruse vähenemine I_r protsentides järgmise valemi abil:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100,$$

kus

— $\%\ I_r$: on keskmise kasvu erikiiruse vähenemise määr protsentides,

— μ_C: on μ keskväärtus kontrollrühmas,

— μ_T: on μ keskväärtus katserühmas.

Saagis

57. Kemikaali mõju saagisele määratakse lähtuvalt kahe mõõdetava muutuja – tallusjate võsude arvu ja veel ühe mõõdetava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) – väärtusest, mis mõõdetakse igas katsekultuuris katse alguses ja lõpus. Kuivmassi või märgmassi algväärtus määratakse tallusjate võsude proovist, mis võetakse katsenõude inokuleerimiseks kasutatavast kultuurist (vt punkt 20). Kontrollrühmas ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse keskmine saagis ning tulemuste hajuvus. Saagise vähenemise määra protsentides (% I_y) võib iga katserühma puhul arvutada järgmiselt:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100,$$

kus

— $\%\ I_y$ on saagise vähenemise määr protsentides,

— b_C on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe kontrollrühmas,

— b_T on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe katserühmas.

Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverate koostamine

58. Tuleks koostada kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverad, mis väljendavad uuritava muutuja väärtuse vähenemise keskmise protsentuaalse määra (punkti 56 või 57 kohaselt arvutatud % I_r või % I_y) sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsiooni logaritmitud väärtusest.

EC_x leidmine

59. EC_x (nt EC_{50}) hinnanguliste väärtuste leidmisel tuleks lähtuda nii keskmisest kasvu erikiirusest (E_rC_x) kui ka saagisest (E_yC_x), mis peaksid kumbki omakorda põhinema tallusjate võsude arvul ja ühel täiendaval mõõdetaval muutujal (tallusjate võsude üldpindalal, kuivmassil või märgmassil). Selle põhjuseks on asjaolu, et teatavad uuritavad kemikaalid mõjutavad tallusjate võsude arvu ja muid mõõdetavaid muutujaid erinevalt. Määratavad mürgisuse näitajad igal arvutataval kasvu pidurdumise tasemel x on seega neli EC_x väärtust: E_rC_x (tallusjate võsude arv), E_rC_x (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või märgmass), E_yC_x (tallusjate võsude arv) ja E_yC_x (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või märgmass).

Statistilised meetodid

60. Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. On võimalik kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast mõjuandmete lineariseerivat teisendamist näiteks probit-, logit- või Weibulli jaotuse kujule (13), kuid tuleks siiski eelistada mittelineaarse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kasvu täielikule pidurdumisele või pidurdumise täielikule puudumisele lähedases olukorras võib kõnealune teisendamine andmevigu võimendada ja analüüsi segada (13). Tuleks silmas pidada,

▼M6

et probit-, logit- või Weibulli teisendusel põhinevad standardsed analüüsimeetodid on ette nähtud binaarsete tunnuste (nt suremus või elulemus) analüüsimiseks ning neid tuleb kasvukiiruse või saagise andmete analüüsimiseks kohandada. Konkreetsed meetodid EC_x väärtuste leidmiseks pidevate andmete alusel on esitatud allikates 14, 15 ja 16.

61. Kummagi uuritava muutuja puhul arvutatakse kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera põhjal EC_x hinnangulised väärtused. Võimaluse korral tuleks määrata iga hinnangulise väärtuse usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Mõjuandmete sobivust regressioonimudeliga tuleks hinnata graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsi tegemisel tuleks kasutada mitte katserühmade andmete keskväärtusi, vaid igas üksikus paralleelkultuuris saadud väärtusi.

62. Kui olemasolevad regressioonimudelid ja -meetodid ei ole katseandmete jaoks sobivad, võib EC_{50} hinnangulise väärtuse ja usalduspiiride leidmiseks kasutada ka lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (17).

63. Et teha kindlaks LOEC ja selle alusel ka NOEC, on vaja võrrelda katserühmade keskväärtusi dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetoditega. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskväärtust võrreldakse seejärel kontrollrühmas saadud keskväärtusega, kasutades sobivat mitmese võrdluse või trenditesti meetodit. Selleks võib sobida Dunnetti või Williamsi test (18, 19, 20, 21). Tuleb hinnata, kas kehtib ANOVA eeldus, et hajuvus on homogeenne. Seda võib teha graafiku alusel või formaalse testi (22), näiteks Levene'i või Bartletti testi abil. Kui hajuvuse homogeensuse eeldus ei kehti, võib mõnikord homogeensuse saavutada andmete logaritmilise teisendamisega. Kui hajuvuse heterogeensus on väga suur ja seda ei saa teisendamisega korrigeerida, tuleks kaaluda mõne muu meetodi, näiteks muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i trenditesti kasutamist. Lisajuhised NOEC määramiseks on esitatud allikas 16.

64. Uute teadussaavutuste põhjal on soovitatud loobuda NOEC mõistest ja asendada see regressiooni teel leitud hinnangulise näitajaga EC_x. Kõnealuse lemmeldega tehtava katse jaoks ei ole sobivat x väärtust veel kindlaks määratud. Sobiv väärtuste vahemik näib olevat 10–20 % (olenevalt uuritavast muutujast) ning soovitatavalt tuleks esitada nii EC_{10} kui ka EC_{20}.

Katseprotokoll

65. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline iseloomustus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, sealhulgas vees lahustuvuse piirkontsentratsioon;

— kemikaali identifitseerimisandmed (nt CASi number) ja puhtus (lisandid).

Katseliik:

— teaduslik nimetus, kloon (kui see on teada) ja päritolu.

Katsetingimused:

— kasutatud katserežiim (staatiline, poolstaatiline või läbivoolurežiim);

— katse alustamise kuupäev ja kestus;

— katsesööde;

— katseplaani kirjeldus: katsenõud ja nende katted, lahuste maht, kolooniate ja tallusjate võsude arv katsenõu kohta katse alguses;

— kasutatud kontsentratsioonid (nominaalne ja asjakohane mõõdetud sisaldus) ja paralleelkultuuride arv kontsentratsiooni kohta;

▼M6

— põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, sh lahustite või dispergeerivate ainete kasutamise kirjeldus;

— katsetemperatuur;

— valgusallikas, valgustustihedus ja valguse ühtlus;

— katse- ja kontrollsöötmete pH väärtused;

— uuritava kemikaali kontsentratsioonid ning kasutatud analüüsimeetod ja asjakohased kvaliteedihindamise andmed (valideerimisuuringud, analüüsiandmete standardhälbed või usalduspiirid);

— tallusjate võsude arvu ja muude mõõdetavate muutujate – kuivmassi, märgmassi või tallusjate võsude pindala – määramise meetodid;

— kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist.

Tulemused:

— töötlemata andmed: tallusjate võsude arv ja muude mõõdetavate muutujate väärtus igas uuritava kemikaaliga kultuuris ja kontrollkultuuris iga vaatluse ja analüüsi puhul;

— iga mõõdetava muutuja keskväärtus ja standardhälve;

— igale kontsentratsioonile vastav kasvukõver (soovitatakse koostada mõõdetava muutuja logaritmitud väärtuste põhjal, vt punkt 55);

— tallusjate võsude arvu kahekordistumise aeg või kasvukiirus kontrollkultuuris;

— uuritavate muutujate arvutatud väärtused igas uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris ning paralleelkultuuride andmete keskväärtused ja variatsioonikordajad;

— kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;

— uuritavate muutujate kaudu määratud mürgisuse lõppnäitajad – nt EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} – ja vastavad usaldusvahemikud; asjaomaste andmete olemasolu korral LOEC ja/või NOEC ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;

— dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamise korral mõju määr, mida on võimalik tuvastada (nt väikseim oluline erinevus);

— katserühma mis tahes kultuuris täheldatud stimuleeriv mõju kasvule;

— nähtavad fütotoksilisuse ilmingud ja tähelepanekud katselahuste kohta;

— tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

(1) ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (uuesti kinnitatud 1998. aastal), lk 733–742. Väljaandes: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. USA Materjalide Katsetamise Ühing, West Conshohocken, PA.

(2) USA Keskkonnakaitseamet (1996). OPPTS 850.4400: Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp. (Avalik kavand.) EPA 712–C–96–156. 8 lk.

(3) Association Française de Normalisation (AFNOR) (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 lk.

(4) Swedish Standards Institute (SIS) (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) of *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 lk (rootsi keeles).

▼M6

(5) Environment Canada (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 – 120 lk.

(6) Environment Canada (1993). Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) Sims, I., Whitehouse, P., ja Lacey, R. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

(8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(9) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon. ISO/DIS 20079: Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) Walbridge, C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. USA Keskkonnakaitseameti aruanne nr EPA–600/3–77 108, september 1977.

(11) Lockhart, W. L., Billeck, B. N., ja Baron, C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia* 118/119: 353–359.

(12) Huebert, D. B., ja Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environ. Toxicol. Chem*. 12: 481–483.

(13) Christensen, E. R., ja Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Environ. Sci. Technol*. 19: 713–718.

(14) Nyholm, N., Sørensen, P. S., Kusk, K. O., ja Christensen, E. R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157–167.

(15) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485–1494.

(16) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(17) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc*. 50: 1096–1121.

(19) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.

(20) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.

(21) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519–531.

(22) Brain, P., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res*. 29: 93–96.

▼M6

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid ja lühendeid.

Biomass – populatsiooni elusaine kuivmass. Kuna käesoleva meetodi puhul mõõdetakse tavaliselt biomassi asendusparameetreid, näiteks tallusjate võsude arvu või pindala, tähistatakse mõistega „biomass" ka kõnealuseid asendusparameetreid.

Kemikaal – aine või segu.

Kloroos – tallusja võsu koe kolletumine.

Kloon – organism või rakk, mis on tekkinud ühest organismist mittesugulise paljunemise tulemusena. Samast kloonist pärit isendid on seega geneetiliselt identsed.

Koloonia – üksteisega ühendatud tallusjate ema- ja tütarvõsude kogum (tavaliselt 2–4 võsu). Mõnikord nimetatakse kolooniat ka taimeks.

EC_x – katsesöötmes lahustatud uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul *Lemna* kasv pidurdub x % (nt 50 %) võrra kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul (kui kokkupuuteaeg erineb katse tavapärasest või täiskestusest, tuleb täpselt märkida selle kestus). Kasvukiiruse või saagise alusel arvutatava EC väärtuse üheselt arusaadavaks tähistamiseks kasutatakse kasvukiiruse puhul tähist „E_rC" ja saagise puhul tähist „E_yC", mille järel märgitakse kasutatud mõõdetav muutuja, nt E_rC (tallusjate võsude arv).

Läbivoolukatse – katse, mille käigus katselahus pidevalt vahetub.

Tallusjas võsu – lemle lehetaoline üksikosa. See on väikseim paljunemisvõimeline osis, st isend.

Puhetumine – tallusja võsu küürdumine või tursumine.

Kasv – mõõdetava muutuja (nt tallusjate võsude arv, kuivmass, märgmass, tallusjate võsude pindala) väärtuse suurenemine katse kestel.

Kasvukiirus (keskmine kasvu erikiirus) – biomassi logaritmiline suurenemine kokkupuuteperioodi jooksul.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) – väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ($p < 0,05$) kasvu pidurdavat mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peab kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil avalduv kahjulik mõju. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleb lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon LOEC (ja sellest lähtuvalt ka NOEC) on valitud.

Mõõdetav muutuja – mis tahes liiki muutuja, mida mõõdetakse katse lõppnäitaja väljendamiseks ühe või mitme eri uuritava muutuja kaudu. Käesoleva meetodi puhul on mõõdetavad muutujad tallusjate võsude arv, tallusjate võsude pindala, märgmass ja kuivmass.

Monokultuur – ühe liigi taimede kultuur.

Nekroos – protsess, mille tagajärjel tekib tallusja võsu surnud (st valge või hügrofaanne) kude.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) – kontsentratsioon, mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool LOEC väärtust.

Fenotüüp – organismi vaadeldavate tunnuste kogum, mis on määratud organismi geenide ja keskkonna vastasmõjuga.

Uuritav muutuja – mürgisuse hindamiseks kasutatav muutuja, mis on tuletatud biomassi kirjeldava mis tahes mõõdetava muutuja põhjal vastavalt asjakohasele arvutusmeetodile. Käesoleva katsemeetodi puhul on uuritavad muutujad kasvukiirus ja saagis, mis tuletatakse sellistest mõõdetavatest muutujatest nagu tallusjate võsude arv või pindala, märgmass või kuivmass.

▼M6

Poolstaatiline (lahusevahetusega) katse – katse, mille käigus katselahus teatava ajavahemiku järel perioodiliselt välja vahetatakse.

Staatiline katse – katse, mille käigus katselahust ei uuendata.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Katse lõppnäitaja – katse eesmärgile vastav üldine näitaja, mis muutub uuritava kemikaali mõjul kontrollrühma asjaomase näitajaga võrreldes. Käesoleva katsemeetodi puhul on katse lõppnäitaja kasvu pidurdumine, mida võib väljendada ühel või mitmel mõõdetaval muutujal põhinevate uuritavate muutujate abil.

Katsesööde – täielik sünteetiline kasvukeskkond, mille pinnal katsetaimi kasvatatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav kemikaal katsesöötmes.

Saagis – kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetava muutuja väärtuste vahe, mis väljendab biomassi suurenemist katse vältel.

▼M6

2. liide

Lemleliikide kirjeldus

Veetaimed üldnimetusega lemled (*Lemna* spp.) kuuluvad lemleliste (*Lemnaceae*) sugukonda, mis hõlmab paljusid ülemaailmse levikuga liike neljast perekonnast. Nende morfoloogilisi erinevusi ja taksonoomiat on ammendavalt kirjeldatud (1, 2). Mürgisuse hindamise katsetes kasutatakse tavaliselt parasvöötmele iseloomulikke liike *Lemna gibba* ja *Lemna minor*. Mõlemal liigil on veepinnal või vees ujuv litrikujuline vars (tallusjas võsu) ja iga tallusja võsu alakülje keskkohale kinnitub väga peenike juur. Lemled õitsevad harva ja paljunevad peamiselt vegetatiivselt uute tallusjate võsude moodustamise teel (3). Noored taimed on vanemate taimedega võrreldes heledamad, lühema juurega ja koosnevad kahest või kolmest eri suurusega tallusjast võsust. Tänu lemle väiksusele, lihtsale ehitusele, mittesugulisele paljunemisele ja lühikesele generatsiooniajale sobivad selle perekonna taimed väga hästi laboratoorseteks katseteks (4, 5).

Kuna tundlikkus uuritava kemikaali suhtes on tõenäoliselt liigiti erinev, saab tundlikkust eri kemikaalide suhtes võrrelda ainult ühe liigi piires.

Näited lemleliikide kasutamise kohta katsetes: viited liigiti

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Filosoofialitsensiaadi väitekiri 1996:2. Stockholmi Ülikooli süsteemiökoloogia instituut.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. *J. Phys. Chem*. 29: 935–941.

Lemna minor: USA Keskkonnakaitseamet (1996). OPPTS 850.4400: Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp. (Avalik kavand.) EPA 712–C–96–156. 8 lk.

Association Française de Normalisation (AFNOR) (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 lk.

Swedish Standards Institute (SIS) (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) of *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 lk (rootsi keeles).

Lemna gibba: ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (uuesti kinnitatud 1998. aastal), lk 733–742.

USA Keskkonnakaitseamet (1996). OPPTS 850.4400: Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp. (Avalik kavand.) EPA 712–C–96–156. 8 lk.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., ja Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. *Arch. Environ. Con. Tox*. 10: 1959–1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R., *et al*. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). *Ecotox. Environ. Safe*. 5: 87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., ja Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environ. Toxicol. Chem*. 12: 481–483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., ja Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. *Verh. Int. Ver. Limnol*. 19: 2102–2111.

Lemleliikide kollektsioonid

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Kanada, M5S 3 B2
Tel: +1 416 978 3641
Faks: +1 416 978 5878
E-post: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695–8002
USA
Tel: +1 919 515 7572
astomp@unity.ncsu.edu

Department of Applied Environmental Science (ITM), Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
ROOTSI
Tel: +46 8 674 7240
Faks: +46 8 674 7636

Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berliin
Saksamaa
E-post: lemna@uba.de

KIRJANDUS

(1) Hillman, W. S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *Bot. Rev*. 27: 221–287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). 2. kd. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Šveits.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environ. Pollut. B* 11: 1–14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ. Res*. 52: 7–22.

▼M6

3. liide

Tüvikultuuri säilitamine

Tüvikultuure võib säilitada pikemat aega madalal temperatuuril (4–10 °C), ilma et neid oleks vaja uuendada. Lemle tüvikultuuride sööde võib olla sama, mida kasutatakse katsetes, kuid võib kasutada ka muid toitainerikkaid söötmeid.

Teatav arv noori helerohelisi taimi viiakse kindla ajavahemiku järel aseptiliselt üle uude värske söötmega kultiveerimisnõusse. Subkultuuride inokuleerimise vaheaeg võib käesolevas liites soovitatud madala temperatuuri korral olla kuni kolm kuud.

Tuleks kasutada keemiliselt puhtaid (happega pestud) steriilseid klaasist kultiveerimisnõusid ja aseptilisi käitlemismeetodeid. Tüvikultuuri saastumisel näiteks vetikate või seentega tuleb võtta meetmed saastavate organismide kõrvaldamiseks. Vetikate ja enamiku muude saastavate organismide puhul võib selleks kasutada pindsteriliseerimist. Saastunud taimsest materjalist võetakse proov ja lõigatakse ära taimede juured. Pärast seda loksutatakse taimset materjali tugevalt puhtas vees ja asetatakse 30 sekundiks kuni 5 minutiks 0,5-mahuprotsendilisse naatriumhüpokloriti lahusesse. Seejärel loputatakse taimset materjali steriilse veega ja viiakse see mitmes osas üle värske söötmega kultiveerimisnõudesse. Sellise töötlemise tagajärjel surevad paljud tallusjad võsud, eriti kui töötlemisaeg on pikem, kuid mõni ellujäänud tallusjas võsu on tavaliselt saastavatest organismidest vaba. Selliseid tallusjaid võsusid saab kasutada uute kultuuride inokuleerimiseks.

▼M6

4. liide

Söötmed

Liikide *L. minor* ja *L. gibba* jaoks soovitatakse kasutada eri söötmeid. Liigi *L. minor* puhul soovitatakse kasutada Rootsi Standardiinstituudi (SIS) söödet modifitseeritud kujul, samas kui liigi *L. gibba* puhul soovitatakse kasutada söödet 20X-AAP. Allpool on esitatud kummagi söötme koostis. Nende söötmete valmistamisel tuleks kasutada analüütilise või reaktiivi puhtusastmega kemikaale ja deioniseeritud vett.

Rootsi Standardiinstituudi (SIS) lemlesööde

— Põhilahused I–V steriliseeritakse autoklaavimise (120 °C, 15 minutit) või membraanfiltrimise (poori läbimõõt umbes 0,2 μm) teel.

— VI põhilahus ja vajaduse korral valmistatav VII põhilahus steriliseeritakse membraanfiltrimise teel; neid lahuseid ei tohiks autoklaavida.

— Steriilseid põhilahuseid tuleks hoida jahedas ja valguse eest kaitstult. Põhilahused I–V tuleks kõrvaldada kuus kuud pärast valmistamist; VI põhilahuse ja vajaduse korral valmistatava VII põhilahuse säilivusaeg on üks kuu.

Põhilahuse nr	Aine	Sisaldus põhilahuses (g/l)	Sisaldus valmissöötmes (mg/l)	Valmissööde	
				Element	Sisaldus (mg/l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,3	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (puhver)	490	490	—	—

Ühe liitri SISi söötme saamiseks lisatakse 900 ml deioniseeritud veele järgmised komponendid:

▼**M6**

— 10 ml I põhilahust,

— 5 ml II põhilahust,

— 5 ml III põhilahust,

— 5 ml IV põhilahust,

— 1 ml V põhilahust,

— 5 ml VI põhilahust,

— 1 ml VII põhilahust (vajaduse korral).

*Märkus:*Täiendav VII põhilahus (MOPSi puhverlahus) võib olla vajalik teatavate uuritavate kemikaalide puhul (vt punkt 11).

Söötme pH reguleeritakse 0,1 või 1 M HCl või NaOH lisamisega väärtusele 6,5 ± 0,2 ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega ühe liitrini.

Sööde 20X-AAP

Põhilahuste valmistamiseks kasutatakse steriilset destilleeritud või deioniseeritud vett.

Steriilseid põhilahuseid tuleks hoida jahedas ja valguse eest kaitstult. Nendes tingimustes on põhilahuste säilivusaeg vähemalt 6–8 nädalat.

Söötme 20X-AAP viie toitainete põhilahuse (A1, A2, A3, B ja C) valmistamiseks kasutatakse reaktiivi puhtusastmega kemikaale. Söötme valmistamiseks lisatakse umbes 850 ml deioniseeritud veele 20 ml iga toitainete põhilahust. Söötme pH reguleeritakse 0,1 või 1 M HCl või NaOH lisamisega väärtusele 7,5 ± 0,1 ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega ühe liitrini. Seejärel filtritakse sööde läbi umbes 0,2 μm suuruste pooridega membraanfiltri steriilsesse nõusse.

Katses kasutamiseks ette nähtud sööde tehakse valmis 1–2 päeva enne kasutamist, et pH saaks stabiliseeruda. Enne kasutamist kontrollitakse söötme pH-d ja reguleeritakse seda vajaduse korral uuesti 0,1 või 1 M NaOH või HCl lisamisega, nagu on kirjeldatud eespool.

Põhilahuse nr	Aine	Sisaldus põhilahuses (g/l) (*)	Sisaldus valmissöötmes (mg/l) (*)	Valmissööde	
				Element	Sisaldus (mg/l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Põhilahuse nr	Aine	Sisaldus põhilahuses (g/l) (*)	Sisaldus valmissöötmes (mg/l) (*)	Valmissööde	
				Element	Sisaldus (mg/l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7, µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,4 µg/l	Cu	0,80 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Kui ei ole märgitud teisiti.

Märkus: teoreetiliselt vajalik vesinikkarbonaadi lõppsisaldus (mille puhul ei ole vaja pH-d märkimisväärselt reguleerida) ei ole 300 mg/l, vaid 15 mg/l. Varem, sealhulgas käesoleva meetodi valideerimiseks tehtud laboritevahelises võrdlusuuringus, on siiski kasutatud söödet 20X-AAP, milles vesinikkarbonaadi sisaldus on 300 mg/l. (Sims, I., Whitehouse, P., ja Lacey, R. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Steinbergi sööde (vastavalt standardile ISO 20079)

Koostisainete sisaldus ja põhilahused

Standardi ISO 20079 puhul kasutatakse modifitseeritud Steinbergi söödet üksnes *Lemna minor*'i jaoks (kuna selle standardi puhul on lubatud kasutada ainult *Lemna minor*'it), kuid katsetest ilmneb, et selle söötmega võib saada häid tulemusi ka *Lemna gibba* puhul.

Söötme valmistamisel tuleks kasutada analüütilise või reaktiivi puhtusastmega kemikaale ja deioniseeritud vett.

Söötme valmistamiseks kasutatakse põhilahuseid või 10 korda kontsentreeritumat söödet (see on suurim kontsentratsioon, mille puhul sadenemist veel ei toimu).

Tabel 1.

Stabiliseeritud pH-ga Steinbergi sööde (modifitseeritud Altenburgeri järgi).

Koostisaine		Sööde	
Makrotoitained	Molekulmass	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Koostisaine		Sööde	
Makrotoitained	Molekulmass	mg/l	mmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	372,24	1 500,00	4,03

Tabel 2.

Põhilahused (makrotoitained).

1. Makrotoitained (50 korda kontsentreeritumad)	**g/l**
Põhilahus 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Põhilahus 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Põhilahus 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabel 3.

Põhilahused (mikrotoitained).

2. Mikrotoitained (1 000 korda kontsentreeritumad)	**mg/l**
Põhilahus 4:	
H_3BO_3	120,0
Põhilahus 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Põhilahus 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Põhilahus 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Põhilahus 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	1 500,00

— Põhilahused 2 ja 3 võib omavahel kokku segada, samuti võib omavahel kokku segada põhilahused 4–7 (võttes arvesse vajalikke kontsentratsioone).

▼**M6**

— Säilivusaja pikendamiseks autoklaavitakse põhilahused 121 °C juures 20 minuti jooksul või steriliseeritakse filtrimise teel (0,2 μm). Põhilahus 8 soovitatakse tungivalt steriliseerida filtrimise teel (0,2 μm).

Vajaliku lõppkontsentratsiooniga modifitseeritud Steinbergi söötme valmistamine

— Umbes 900 ml deioniseeritud veele lisatakse sadenemist ära hoides 20 ml iga põhilahust 1, 2 ja 3 (vt tabel 2).

— Lisatakse 1,0 ml iga põhilahust 4, 5, 6, 7 ja 8 (vt tabel 3).

— Söötme pH peaks olema 5,5 ± 0,2 (pH reguleerimiseks lisatakse väikseim vajalik kogus NaOH või HCl lahust).

— Lahuse ruumala viiakse veega 1 000 milliliitrini.

— Kui põhilahused on steriilsed ja kasutatakse nõuetekohast vett, ei ole söödet vaja täiendavalt steriliseerida. Valmissöötme steriliseerimise korral lisatakse põhilahus 8 pärast autoklaavimist (20 minutit temperatuuril 121 °C).

Pikemaajaliseks säilitamiseks ette nähtud 10 korda kontsentreerituma modifitseeritud Steinbergi söötme valmistamine

— Umbes 30 ml veele lisatakse sadenemist ära hoides 20 ml iga põhilahust 1, 2 ja 3 (vt tabel 2).

— Lisatakse 1,0 ml iga põhilahust 4, 5, 6, 7 ja 8 (vt tabel 3). Lahuse ruumala viiakse veega 100 milliliitrini.

— Kui põhilahused on steriilsed ja kasutatakse nõuetekohast vett, ei ole söödet vaja täiendavalt steriliseerida. Valmissöötme steriliseerimise korral lisatakse põhilahus 8 pärast autoklaavimist (20 minutit temperatuuril 121 °C).

— Söötme pH peaks lõppkontsentratsiooni juures olema 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD SETTE KASUTAMISEGA

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 218 (2004). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata pikaajalise kemikaalidega kokkupuute mõju setetes elavatele magevee kahetiivaliste (*Chironomus* sp.) vastsetele. See põhineb *Chironomus riparius'*e ja *Chironomus tentans'*i kohta olemas olevatel mürgisuse määramise katse eeskirjadel, mis on koostatud Euroopas (1, 2, 3) ja Põhja-Ameerikas (4, 5, 6, 7, 8) ning mille puhul on tehtud laboritevahelised võrdluskatsed (1, 6, 9). Võib kasutada ka muid hästi dokumenteeritud surusääsklaste liike, näiteks *Chironomus yoshimatsui'*d (10, 11).

2. Käesolevas katsemeetodis kasutatav kokkupuutestsenaarium on sette rikastamine uuritava kemikaaliga. Sobiva kokkupuutestsenaariumi valimine oleneb katse kavandatud eesmärgist. Sette kemikaaliga rikastamise stsenaarium on kavandatud settes püsivate kemikaalide akumuleerunud tasemete simuleerimiseks. Käesolevas kokkupuutesüsteemis rikastatakse sette-vee katsesüsteemis setet kemikaaliga.

3. Ained, mille kohta on vaja teha katsed settes elavate organismidega, jäävad tavaliselt sellesse keskkonda pikaks ajaks püsima. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga mitmel viisil kokku puutuda. Iga kokkupuutetee suhteline tähtsus ja aeg, mis on iga kokkupuutetee puhul vajalik üldisse mürgisusse panuse andmiseks, sõltub asjaomase kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Tugevasti adsorbeeruvate ainete (näiteks log K_{ow} > 5) või settega kovalentseid sidemeid moodustavate ainete puhul võib tähtis kokkupuutetee olla manustamine saastunud toiduga. Väga lipofiilsete ainete mürgisuse alahindamise vältimiseks võib kaaluda settele sööda lisamist enne uuritava aine kasutamist. Kõigi võimalike kokkupuuteteede arvessevõtmiseks on käesolevas katsemeetodis keskendutud pikaajalisele kokkupuutele. *C. riparius'*e ja *C. yoshimatsui* puhul kestab katse 20–28 päeva ning *C. tentans'*i puhul 28–65 päeva. Kui konkreetsel põhjusel vajatakse andmeid lühema aja kohta, näiteks ebastabiilse kemikaali mõju uurimiseks, võib kümnepäevase ajavahemiku järel võtta täiendavad paralleelproovid.

4. Mõõdetavad näitajad on vastsetest arenenud valmikute koguarv ja nende arenemiseks vajalik aeg. Vastsete elulemust ja kasvu soovitatakse mõõta alles pärast kümnepäevase ajavahemiku möödumist; kui lisaks vajatakse andmeid lühema aja kohta, kasutatakse vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid.

5. Soovitatakse kasutada spetsiaalselt koostatud setet. Spetsiaalselt koostatud settel on loodusliku sette ees mitmeid eeliseid:

   — väheneb katsete hajuvus, kuna nii saadakse reprodutseeritav standardiseeritud maatriks ning kõrvaldatakse vajadus saastumata ja puhaste setteallikate leidmiseks;

   — katseid võib alustada ükskõik millal, ei tule arvestada katse setete hooajalist muutlikkust ja setet ei ole vaja eeltöödelda kohaliku fauna kõrvaldamiseks; spetsiaalselt koostatud sette kasutamine vähendab samuti korrapäraseks katsetamiseks kohapeal piisavas koguses sette kogumisega seotud kulusid;

   — spetsiaalselt koostatud sette kasutamine võimaldab mürgisust võrrelda ja selle põhjal aineid järjestada.

6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

▼M4

KATSE PÕHIMÕTE

7. Kõigepealt puutuvad surusääsklaste esimese kasvujärgu vastsed kokku sette-vee süsteemis teatavas kontsentratsioonivahemikus oleva uuritava kemikaaliga. Uuritavat ainet lisatakse settesse ja esimese kasvujärgu vastsed lisatakse seejärel katsenõudesse, milles kontsentratsioonid settes ja vees on tasakaalustunud. Katse lõpus mõõdetakse surusääsklaste väljaarenemise määra ja arengu kiirust. Vastsete elulemust ja massi võidakse vajaduse korral mõõta ka kümne päeva möödumisel (kasutades vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid). Neid andmeid analüüsitakse kas regressioonimudeli abil, et hinnata kontsentratsioon, mis põhjustab valmikute väljaarenemise või vastsete elulemuse või kasvu x % vähenemise (näiteks EC_{15}, EC_{50} jne), või kasutades täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni määramiseks statistilise hüpoteesi testimise meetodit. Viimati nimetatud juhul tuleb täheldatud mõju väärtusi võrrelda statistiliste testide abil kontrollkatses määratud väärtustega.

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

8. Teada peaks olema uuritava aine lahustuvus vees, aururõhk, mõõdetud või arvutatud jaotumine settesse ning stabiilsus vees ja settes. Kättesaadav peaks olema usaldusväärne analüüsimeetod uuritava aine kvantitatiivseks määramiseks katvas veekihis, poorivees ja settes; meetodi täpsus ja määramispiir peaksid olema teada. Kasulik on teada uuritava aine struktuurivalemit ja puhtust. Samuti on kasulik teada uuritava aine keemilist käitumist (näiteks hajumine, abiootiline ja biootiline lagunemine jne). Täiendavad juhised selliste ainete mõju uurimiseks, mille füüsikalis-keemilised omadused raskendavad selle katse tegemist, on esitatud väljaandes (12).

VÕRDLUSKEMIKAALID

9. Katse-eeskirjade ja -tingimuste täitmise usaldusväärsuse tagamiseks võib korrapäraselt katsetada võrdluskemikaale. Laboritevahelistes võrdlustes ja valideerimisuuringutes edukalt kasutatud võrdlustoksikandid on näiteks lindaan, trifluraliin, pentaklorofenool, kaadmiumkloriid ja kaaliumkloriid (1, 2, 5, 6, 13).

KATSE KEHTIVUS

10. Katse kehtivuse tõendamisel arvestatakse järgmist:

— kontrollnõus peab katse lõpuks välja arenema vähemalt 70 % putukaid (1, 6);

— *C. riparius'*e ja *C. yoshimatsui* valmikud peaksid kontrollnõudes välja arenema 12–23 päeva jooksul pärast nende viimist nõudesse; *C. tentans'*i puhul on vajalik ajavahemik 20–65 päeva;

— katse lõpus tuleks igas nõus mõõta pH ja lahustunud hapniku kontsentratsioon. Hapnikukontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest kasutataval temperatuuril ja katva veekihi pH peaks kõigis katsenõudes olema vahemikus 6–9;

— vee temperatuur ei tohiks erineda rohkem kui ±1,0 °C võrra. Vee temperatuuri on võimalik kontrollida isotermilise ruumi abil ja sel juhul peaks ruumi temperatuur olema sobivate ajavahemike järel kinnitatud.

▼M4

MEETODI KIRJELDUS

Katsenõud

11. Uuring tehakse 600 ml klaasist katsenõudega, mille läbimõõt on 8 cm. Muud nõud on sobivad, kuid need peaksid tagama katva veekihi ja sette vajaliku paksuse. Sette pind peaks olema piisav, et tagada vastse kohta 2–3 cm^2. Settekihi paksuse ja katva veekihi paksuse suhe peaks olema 1 : 4. Katsenõud ja muud seadmed, mis katsesüsteemiga kokku puutuvad, peaksid olema valmistatud täies ulatuses klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist (näiteks teflonist).

Liigi valimine

12. Katses kasutatav liik on eelistatavalt *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* on samuti sobiv, aga selle käsitlemine on keerukam ja see nõuab pikemat katseperioodi. *Chironomus yohimatsui* kasutamine on samuti võimalik. 2. liites on esitatud andmed *Chironomus riparius'*e kultuuri kasvatamise meetodite kohta. Ka muude liikide, nagu *Chironomus tentans'*i (4) ja *Chironomus yoshimatsui* (11) kultuuri kasvatamise tingimused on avaldatud. Enne katset tuleb kinnitada liigi määramist, aga seda ei nõuta enne iga katset, kui organismid pärinevad asutusesisesest kultuurist.

Sete

13. Eelistatavalt tuleks kasutada spetsiaalselt koostatud setet (mida nimetatakse ka taastatud, tehislikuks või sünteetiliseks setteks). Loodusliku sette kasutamise korral tuleks seda iseloomustada (vähemalt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, samuti on soovitatav määrata muud parameetrid, nagu süsinikulämmastiku suhe ja granulomeetria) ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid ega muid organisme, kes võiksid surusääsklastega konkureerida või neid süüa. Enne loodusliku sette kasutamist surusääsklastel avalduva mürgisuse katses on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus. Käesolevas katses soovitatakse kasutada järgmist spetsiaalselt koostatud setet, mis põhineb katsemeetodis C.8 (14) kasutataval tehismullal (1, 15, 16):

a) 4–5 % (kuivmass) turvast: pH väärtus võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; tähtis on kasutada peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) pulbrilist turvast, mida on kuivatatud ainult õhu käes;

b) 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (kaoliniidisisaldus eelistatavalt üle 30 %);

c) 75–76 % (kuivmass) kvartsliiva (see peaks peamiselt koosnema peenest liivast ja rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm);

d) lõplikus segus niiskusesisalduse 30–50 % saamiseks lisatakse deioniseeritud vett;

e) sette lõpliku segu reguleerimiseks pH vahemikku 7,0 ± 0,5 lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$). Lõpliku segu orgaanilise süsiniku sisaldus peaks olema 2 % (±0,5 %) ja see tuleks õigeks seada sobivas koguses turba ja liiva kasutamisega kooskõlas alapunktidega a ja c.

14. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada. Sette koostisosi tuleks kontrollida, et tõendada keemilise saaste puudumine (näiteks raskmetallid, kloororgaanilised ühendid, fosfororgaanilised ühendid jne). Spetsiaalselt koostatud sette valmistamise näidis on esitatud 3. liites. Kuivade koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast katva veekihi lisamist ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste hõljumist) ja et turvas või sete on piisavalt konditsioneerunud.

▼M4

Vesi

15. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 2. ja 4. liites esitatud lahjendamiseks kasutatava vee nõutavatele keemilistele omadustele. Kasvuveena ja katseveena lubatakse kasutada iga sobivat vett, looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett (vt 2. liide) või deklooritud kraanivett, kui surusääsklased jäävad selles kasvatamise ja katsetamise ajal ellu ega ilmuta stressi tunnuseid. Katse alguses peaks katsevee pH olema vahemikus 6–9 ja vee summaarne karedus ei tohiks olla suurem kui 400 mg/l $CaCO_3$-na. Kui oletatakse karedust tekitavate ioonide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada siiski väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks sel juhul kasutada Elendti kasvukeskkonda M4). Kogu uuringu vältel tuleks kasutada sama tüüpi vett. 4. liites loetletud vee kvaliteedi omadusi tuleks mõõta vähemalt kaks korda aastas või siis, kui kahtlustatakse, et kõnealused omadused võivad olla oluliselt muutunud.

Põhilahused – rikastatud setted

16. Tavaliselt valmistatakse valitud kontsentratsiooniga rikastatud setted uuritava aine lahuse otse settesse lisamise teel. Deioniseeritud vees lahustatud uuritava aine põhilahus segatakse spetsiaalselt koostatud settega rullimisseadme või söödasegaja abil või käsitsi. Vees halvasti lahustuva uuritava aine võib lahustada võimalikult väikses sobiva orgaanilise lahusti (näiteks heksaan, atsetoon või kloroform) koguses. See lahus segatakse ühes katsenõus seejärel 10 g peene kvartsliivaga. Lahustil lastakse auruda ja see tuleb liivast täielikult kõrvaldada; seejärel segatakse liiv katsenõu jaoks sobivas koguses settega. Uuritava aine solubiliseerimiseks, dispergeerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada ainult kergesti lenduvaid aineid. Tuleks meeles pidada, et sette valmistamisel tuleb arvesse võtta uuritava aine ja liiva segust pärit liiva (s.o sete tuleks siis valmistada väiksema liivakogusega). Tuleks hoolitseda, et settele lisatud uuritav aine oleks settes põhjalikult ja ühtlaselt jaotatud. Vajaduse korral võib homogeensuse taseme määramiseks analüüsida alamproove.

KATSE KAVANDAMINE

17. Katse kavandamine hõlmab katse kontsentratsioonide arvu ja vahemike valimist, iga kontsentratsioonitaseme jaoks nõude arvu ning igas nõus olevate vastsete arvu valimist. Kirjeldatud on, kuidas hinnata EC-punktide väärtusi ja täheldatava toimeta kontsentratsiooni ning teha piirsisalduskatset.

Regressioonanalüüsi kavandamine

18. Katses kasutatavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama toimet avaldavat kontsentratsiooni (nt EC_{15}, EC_{50}) ja uuritava aine puhul huvi pakkuvat kontsentratsioonivahemikku. Tavaliselt paraneb toimet avaldavate kontsentratsioonide (EC_x) hinnangute täpsus ja eelkõige kehtivus, kui toimet avaldav kontsentratsioon on uuritud kontsentratsioonide vahemikus. Tuleks vältida suurt ekstrapoleerimist allapoole väikseimat positiivset kontsentratsiooni või ülespoole suuremat kontsentratsiooni. Eelnev annusevahemiku leidmise katse aitab valida kasutatavat kontsentratsioonivahemikku (vt punkt 27).

▼M4

19. Kui tuleb hinnata EC_x, tuleks katse teha vähemalt viie kontsentratsiooniga ja iga kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada kolme paralleelkatset. Igal juhul on mudeli korraliku hindamise jaoks soovitatav kasutada piisavaid uuritavaid kontsentratsioone. Kontsentratsioonidevaheline kordaja ei tohiks olla suurem kui 2 (erandi võib teha juhul, kui doosi mõju graafiku tõus on madal). Iga doosi paralleelkatsete arvu võib vähendada, kui suurendatakse eri mõjuga uuritavate kontsentratsioonide arvu. Paralleelkatsete arvu suurendamine või uuritavate kontsentratsioonide vahemiku vähendamine enamasti vähendab usaldusvahemikku. Kui on vaja hinnata vastsete elulemust ja kasvu kümne päeva järel, on vaja võtta täiendavaid paralleelproove.

Täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni hindamise kavandamine

20. Kui hinnatakse täheldatava toimeta kontsentratsiooni või vähimat täheldatava toimega kontsentratsiooni, tuleks kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni vähemalt nelja paralleelkatsega ja kõnealuseid kontsentratsioone eraldav kordaja ei tohiks olla suurem kui 2. Paralleelkatsete arv peaks olema piisav, et tagada piisav statistiline võimsus, et tuvastada katse- ja kontrollseadme tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ($p = 0,05$). Arengu kiiruse puhul on üldiselt asjakohane variatsioonanalüüs (ANOVA), näiteks Dunnetti test ja Williamsi test (17, 18, 19, 20). Väljaarenemise suhte puhul võib kasutada Cochrani-Armitage'i testi, Fisheri täpset testi (Bonferroni parandusega) või Manteli-Haenszeli testi.

Piirsisalduskatse

21. Kui esialgsetes annusevahemiku leidmise katsetes tulemusi ei saadud, võib teha piirsisalduskatse (üks katsekontsentratsioon ja kontroll). Piirsisalduskatse eesmärk on teha katse kontsentratsioonil, mis on piisavalt suur, et otsustajad võiksid uuritava aine mürgisuse välistada, ning piirsisalduseks võetakse kontsentratsioon, mida eeldatavasti üheski olukorras ei teki. Soovitatakse kasutada 1 000 mg/kg (kuivmass). Enamasti tuleb nii töötlus- kui ka kontrollseadmetega teha vähemalt kuus paralleelkatset. Tuleks tõendada piisava statistilise võimsuse olemasolu, et tuvastada katse- ja kontrollseadme tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ($p = 0,05$). Mõõdetavate suuruste (arengu kiirus ja kaal) puhul, kui andmed vastavad käesoleva katse nõuetele (normaalsus, ühtlane hajumine), on asjakohane statistiline meetod t-kriteerium. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mittevõrdse hajumise t-kriteeriumi või mitteparameetrilist testi, näiteks Wilcoxoni-Manni-Whithey testi. Valmikute väljaarenemise suhte puhul on asjakohane kasutada Fisheri täpset testi.

KATSE KÄIK

Kokkupuutetingimused

Rikastatud sette-vee süsteemi valmistamine

22. Uuritavate ainete lisamiseks soovitatakse kasutada rikastamismeetodit, mida on kirjeldatud katsemeetodis C.8 „Toksilisus vihmaussidele" (14). Rikastatud setted asetatakse nõudesse ja neile lisatakse kattev veekiht, et saada sette-vee ruumala suhe 1 : 4 (vt punktid 11 ja 15). Settekihi paksus peaks olema 1,5–3 cm. Sette osade eraldumise ja veesambas katsevee lisamisel peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta vee valamise ajal plastikkettaga, mis pärast vee valamist kohe eemaldatakse. Võib kasutada ka muid võtteid.

23. Katsenõud peaksid olema kaetud (näiteks klaasplaadiga). Vajaduse korral lisatakse vee aurumise kompenseerimiseks ja uuringu algse veetaseme saavutamiseks vett. Soolade kogunemise vältimiseks tuleks lisada destilleeritud või deioniseeritud vett.

▼M4

Püsikindluse tagamine

24. Kui rikastatud sete koos katva veekihiga on valmistatud, on soovitatav lasta uuritaval kemikaalil jaotuda vee ja sette vahel (3, 4, 6, 13). Seda tuleks eelistatavalt teha katses kasutatavates temperatuuri- ja õhustustingimustes. Vajalik tasakaalustumisaeg sõltub settest ja kemikaalist ning võib kesta tunde, päevi ja harvadel juhtudel isegi kuni mitu nädalat (4–5 nädalat). Kuna paljud kemikaalid võivad sellise aja jooksul laguneda, ei oodata tasakaaluoleku teket, vaid soovitatakse 48-tunnist tasakaalustamise ajavahemikku. Kõnealuse täiendava tasakaalustamise ajavahemiku lõpus tuleks mõõta uuritava aine kontsentratsioon katvas veekihis, poorivees ja settes vähemalt suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil (vt punkt 38). Need uuritava aine analüütilised määramised võimaldavad arvutada massitasakaalu ja väljendada tulemusi mõõdetud kontsentratsioonide alusel.

Katseorganismide lisamine

25. Neli kuni viis päeva enne katseorganismide lisamist katsenõudesse tuleks võtta kultuuridest munamassid ja asetada need väikestesse nõudesse kultuuri kasvukeskkonnas. Võib kasutada varukultuuri vana kasvukeskkonda või värskelt valmistatud kasvukeskkonda. Viimati nimetatu kasutamisel tuleks lisada kultuuri kasvukeskkonnale väikses koguses sööta, näiteks rohevetikaid ja/või paar tilka peeneks jahvatatud helbelise kalasööda suspensiooni filtraadist (vt 2. liide). Tuleks kasutada ainult värskelt munetud munamasse. Tavaliselt hakkavad vastsed kooruma paari päeva möödumisel munade munemisest (2–3 päeva *Chironomus riparius'*e puhul temperatuuril 20 °C ning 1–4 päeva *Chironomus tentans'*i puhul temperatuuril 23 °C ja *Chironomus yoshimatui* puhul temperatuuril 25 °C) ja vastsed kasvavad neljas kasvujärgus, millest iga kasvujärk kestab 4–8 päeva. Katses tuleks kasutada esimese kasvujärgu vastseid (2–3 või 1–4 päeva pärast koorumist). Sääskede kasvujärke on võimalik kontrollida peakapsli laiuse mõõtmisega (6).

26. Tõmbi pipeti abil jaotatakse 20 esimese kasvujärgu vastset juhuslikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad rikastatud setet ja vett. Vee aereerimine tuleb vastsete katsenõudesse lisamise ajal peatada ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist (vt punktid 25 ja 32). Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatud vastsete arv kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni (EC-punkti) hindamise korral vähemalt 60 ja täheldatava toimeta kontsentratsiooni määramise korral 80.

Uuritavad kontsentratsioonid

27. Annusevahemiku leidmise katse võib aidata kindlaks teha lõpliku katse kontsentratsioonivahemikke. Selleks kasutatakse uuritava aine laiade vahedega kontsentratsioonide seeriat. Lõplikus katses kasutatavaga sama pindtiheduse tagamiseks iga surusääsklase kohta puutuvad surusääsklased kokku uuritava aine iga kontsentratsiooniga sellise ajavahemiku vältel, mis võimaldab hinnata asjakohaseid katsekontsentratsioone; paralleelproovid ei ole vajalikud.

28. Lõpliku katse kontsentratsioonid määratakse kindlaks annusevahemiku leidmise katse tulemuse alusel. Tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja need tuleks valida nii, nagu on kirjeldatud punktides 18–20.

▼M4

Kontrollkatsed

29. Katse peaks hõlmama vajalikku arvu paralleelseid settega kontrollkatsenõusid, milles ei ole uuritavat ainet (vt punktid 19–20). Kui uuritava aine lisamiseks on kasutatud lahustit (vt punkt 16), siis tuleks teha settele lahusti lisamise kontrollkatse.

Katsesüsteem

30. Kasutatakse staatilisi süsteeme. Erandjuhul võib kasutada poolstaatilisi või läbivooluga süsteeme koos katva veekihi vahelduva või pideva uuendamisega, näiteks kui vee kvaliteet ei ole katseorganismile enam sobiv või mõjutab kemikaali tasakaaluolekut (näiteks lahustunud hapniku tase langeb liiga madalale, väljutatud saaduste kontsentratsioon muutub liiga suureks või settest leostuvad mineraalained, mis mõjutavad pH-d ja/või vee karedust). Tavaliselt on siiski piisavad ja eelistatavad muud katva veekihi kvaliteedi parandamise meetodid, näiteks aereerimine.

Sööt

31. Vastseid tuleb sööta eelistatavalt iga päev või vähemalt kolm korda nädalas. Kalasööt (suspensioon vees või peeneks jahvatatud sööt, näiteks TetraMin või TetraPhyll; vt andmed, 2. liide) koguses 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui* puhul) vastse kohta päevas näib olevat esimese kümne päeva jooksul noorte vastsete jaoks piisav. Vanemad vastsed võivad vajada mõnevõrra rohkem sööta: 0,5–1 mg vastse kohta päevas peaks olema piisav ülejäänud katse vältel. Söödakogust tuleks vähendada kõigi töötlemiste korral ja reguleerida, kui täheldatakse seente kasvu või kui kontrollkatses täheldatakse suremust. Kui seente kasvu ei ole võimalik peatada, tuleb katset korrata. Kui katseid tehakse tugevalt adsorbeeruva ainega (näiteks log K_{ow} > 5) või settega kovalentseid sidemeid tekitava ainega, võib enne stabiliseerumise ajavahemikku lisada spetsiaalselt koostatud settele sellise söödakoguse, mis on vajalik organismide elulemuse ja loodusliku kasvu tagamiseks. Selleks tuleb kasutada kalasööda asemel taimset materjali, näiteks võib kasutada 0,5 % (kuivmass) kõrvenõgese (*Urtica dioica*), mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) peeneks jahvatatud lehti või muud taimset materjali (*Cerophyl* või alfatselluloos).

Inkubeerimistingimused

32. Eelistatavalt 24 tundi pärast vastsete lisamist hakatakse katsenõudes katvat veekihti kergelt aereerima, mida jätkatakse kogu katse vältel (tuleb olla hoolikas, et lahustunud hapniku kontsentratsioon ei langeks alla 60 % hapniku küllastuskontsentratsioonist). Aereerimiseks kasutatakse klaasist Pasteuri pipetti, mis on kinnitatud settekihi kohale 2–3 cm kõrgusele (üks või mõni mull sekundis). Lenduva kemikaali katsetamisel võib kaaluda sette-vee süsteemi aereerimisest loobumist.

33. Katse tehakse püsival temperatuuril 20 °C (±2 °C). *C. tentans*'i ja *C. yoshimatui* puhul on soovitatavad temperatuurid vastavalt 23 °C ja 25 °C (±2 °C). Kasutatakse 16-tunnist valgustusperioodi ja valguse intensiivsus peaks olema 500 kuni 1 000 luksi.

▼M4

Kokkupuute kestus

34. Kokkupuude algab vastsete lisamisega rikastatud ja kontrollnõudesse. Maksimaalne kokkupuute kestus on 28 päeva *C. riparius'*e ja *C. yoshimatsui* puhul ning 65 päeva *C. tentans'*i puhul. Kui sääsed arenevad välja varem, võib katse lõpetada vähemalt viie päeva möödumisel pärast viimase valmiku väljaarenemist kontrollnõus.

Vaatlused

Väljaarenemine

35. Tehakse kindlaks arengu aeg ning täielikult väljaarenenud isas- ja emassääskede koguarv. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.

36. Katsenõusid tuleks vaadelda vähemalt kolm korda nädalas, et hinnata visuaalselt iga ebatavalist käitumist (näiteks settest väljumine, ebatavaline ujumine) kontrollnõuga võrreldes. Oodataval valmikute ilmumise ajal loendatakse sääski iga päev. Registreeritakse täielikult väljaarenenud sääskede sugu ja arv. Pärast tuvastamist kõrvaldatakse sääsed nõudest. Enne katse lõpetamist munetud munamassid tuleks registreerida ja seejärel eemaldada, et vältida settesse uute vastsete teket. Samuti registreeritakse nende nähtavate nukkude arv, millest sääsk ei koorunud. Suunised väljaarenemise mõõtmise kohta on esitatud 5. liites.

Kasvamine ja elulemus

37. Kui on vaja esitada andmeid vastsete elulemuse ja kasvu kohta kümne päeva jooksul, tuleks katset alustada suurema arvu nõudega, et neid oleks võimalik seejärel kasutada. Kõnealuste täiendavate nõude setteid sõelutakse vastsete saamiseks 250 μm sõela abil. Surma tuvastamise kriteeriumid on liikumatus või reageerimatus mehaanilisele stiimulile. Vastsed, keda ei õnnestunud kätte saada, tuleks samuti surnuks lugeda (vastsed, kes surid katse alguses, võivad olla juba mikroobide poolt lagundatud). Tehakse kindlaks ellujäänud vastsete (tuhavaba) kuivmass katsenõu kohta ja arvutatakse keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta. Kasulik on määrata, millisesse kasvujärku ellujäänud vastsed kuuluvad; selleks võib mõõta iga isendi peakapsli laiust.

Analüütilised mõõtmised

Uuritava aine kontsentratsioon

38. Uuritava aine kontsentratsiooni analüütiliseks määramiseks settes võetakse sette proovid enne katse algust (s.o vastsete lisamist) vähemalt ühest nõust iga kokkupuutetaseme kohta. Soovitatakse, et katse alguses (vt punkt 24) ja lõpus analüüsitakse suurimal ja väikseimal kontsentratsioonil vähemalt katva veekihi, poorivee ja sette proove. Kõnealused uuritava aine kontsentratsiooni määramised annavad teavet uuritava aine käitumise/jaotumise kohta vee-sette süsteemis.

39. Kui tehakse vahepealseid mõõtmisi (näiteks seitsmendal päeval) või kui analüüsi jaoks on vaja suurt proovi, mida ei saa katsenõust ilma katsesüsteemi mõjutamata võtta, tuleks analüüs teha samal viisil töödeldud, kuid bioloogilisteks vaatlusteks mitte kasutatavast täiendavast katsenõust (kus on ka katseorganismid) võetud proovist.

▼M4

40. Tsentrifuugimine näiteks 10 000 g ja 4 °C juures 30 minuti vältel on soovitatav meetod poorivee eraldamiseks. Kui on tõendatud, et uuritav aine ei adsorbeeru filtritele, võib sobida ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi liiga väikse proovi suuruse tõttu olla võimalik poorivee kontsentratsiooni määramine.

Füüsikalis-keemilised parameetrid

41. Katsenõude pH-d ja temperatuuri (vt punkt 10) tuleks mõõta asjakohasel viisil. Katse alguses ja lõpus tuleks kontrollnõudes ja ühes suurima kontsentratsiooniga katsenõus mõõta karedust ja ammoniaaki.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

42. Kõnealuse katse eesmärk on teha kindlaks uuritava aine mõju isas- ja emassääskede arengu kiirusele ning täielikult välja arenenud sääskede koguarvule või kümnepäevase katse korral mõju vastsete elulemusele ja kehamassile. Kui puuduvad andmed sugude statistiliselt erineva tundlikkuse kohta, võib statistilistes analüüsides isaste ja emaste tulemused koondada. Sugude erinevat tundlikkust on võimalik statistiliselt hinnata näiteks χ^2-r × 2 tabeli testi abil. Vajaduse korral tuleb kümne päeva möödumisel teha kindlaks vastsete elulemus ja keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta.

43. Toimet avaldavad kontsentratsioonid, mis põhinevad kuivmassil ja väljendatakse kuivmassina, arvutatakse eelistatavalt katse alguses mõõdetud sette kontsentratsioonide alusel (vt punkt 38).

44. EC_{50} või muu EC_x-näitaja arvutamiseks võib tegelike paralleelproovidena kasutada nõude statistikat. Iga EC_x usaldusvahemiku arvutamisel tuleks arvesse võtta eri nõude tulemuste hajumist või tuleks näidata, et kõnealune hajumine on nii väike, et seda võib eirata. Kui andmeid töödeldakse mudeli parameetrite leidmiseks vähimruutude meetodiga, tuleks nõu statistikat teisendada, et dispersioon oleks ühtlasem. EC_x-väärtused tuleks siiski arvutada pärast tulemuse esialgsele väärtusele tagasiteisendamist.

45. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha hüpoteesi katsetamise abil kindlaks täheldatava toimeta kontsentratsioon / vähim täheldatava toimega kontsentratsioon, tuleb võtta arvesse nõudevahelist hajuvust, näiteks kasutada hierarhilist dispersioonanalüüsi (*nested* ANOVA). Olukorras, kus tavapärased dispersioonanalüüsi (ANOVA) eeldused ei ole täidetud, võivad paremini sobida töökindlamad testid (21).

Väljaarenemise määr

46. Väljaarenemise määrad on kõik-või-mitte-midagi-andmed ja neid on võimalik analüüsida astmeliselt kohaldatava Cochrani-Armitage'i testi abil, kus eeldatakse, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, ja need andmed on selle eeldusega kooskõlas. Vastasel juhul võib kasutada Fisheri täpset testi või Manteli-Haenszeli testi Bonferroni-Holmi kohandatud p-väärtustega. Kui on tõendeid, et ühe kontsentratsiooniga paralleelproovide hajuvus on suurem, kui eeldatakse binoomjaotuse dispersiooni puhul (nn ekstra-binoomjaotuse dispersioon), tuleks kasutada töökindlat Cochrani-Armitage'i või Fisheri täpset testi, nagu on soovitatud (21).

▼**M4**

Määratakse nõu kohta välja arenenud sääskede arv n_e, mis jagatakse lisatud vastsete arvuga n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kus:

ER = väljaarenemise määr

n_e = nõu kohta välja arenenud sääskede arv

n_a = nõu kohta lisatud vastsete arv.

47. Ekstra-binoomjaotuse dispersiooni korral on suurte valimite puhul kõige asjakohasem alternatiiv käsitleda väljaarenemise määra pideva vastusena ning kasutada selliseid meetodeid nagu Williamsi test, kui võib eeldada, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, kui see on kooskõlas kõnealuste väljaarenemise määra andmetega. Kui monotoonsust ei ole, on asjakohane kasutada Dunnetti testi. Suur valim on siinkohal määratletud kui väljaarenenud sääskede arv ja väljaarenemata jäänud sääskede arv, mis mõlemad on suuremad kui viis paralleelproovi (nõu) kohta.

48. Dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetodite kohaldamiseks tuleks väljaarenemise määra väärtused kõigepealt teisendada arkussiinus-ruutjuure-teisenduse või Freemani-Tukey teisenduse abil, et saada ligikaudne normaaljaotus ja võrdsustada variatsioonid. Cochrani-Armitage'i testi, Fisheri täpse testi (Bonferroni) või Manteli-Haenszeli testi võib kasutada absoluutsete sageduste kasutamisel. Arkussiinus-ruutjuure-teisendust kohaldatakse, arvutades väljaarenemise määra ruutjuure siinuse pöördarvu ($\sin^{-1}$).

49. Väljaarenemise määrade puhul arvutatakse EC_x-väärtused regressioonanalüüsi (või näiteks probit- (22) või logit-teisenduse, Weibulli meetodi, sobiva müügiloleva tarkvara jne) abil. Kui regressioonanalüüs ebaõnnestub (näiteks kui on vähem kui kaks osalist vastust), kasutatakse muid mitteparameetrilisi meetodeid, näiteks libisev keskmine või lihtne interpolatsioon.

Arengu kiirus

50. Keskmine arengu aeg on keskmine ajavahemik vastsete lisamise (katse päev 0) ja sääskede katsekohordi tekke vahel. (Tegeliku arenguaja arvutamiseks tuleks arvesse võtta vastsete vanust lisamise ajal.) Arengu kiirus on pöördvõrdeline arengu ajaga (ühik: 1/päev) ja väljendab vastsete arengu seda osa, mis toimub ühe päeva jooksul. Kõnealuste sette mürgisuse hindamise uuringute puhul eelistatakse arengu kiirust, kuna selle dispersioon on väiksem, homogeensem kui arenguaja puhul ja lähedasem normaaljaotusele. Seega võib arengu kiiruse puhul kasutada tugevaid parameetrilisi testimismeetodeid, mida ei saa kasutada arenguaja puhul. Arengu kiiruse kui pideva vastuse jaoks saab EC_x-väärtusi hinnata regressioonanalüüsiga (näiteks 23, 24).

51. Järgmiste statistiliste testide puhul eeldatakse, et kontrolli päeval x täheldatud sääsed on välja arenenud keskmisel ajavahemikul päeva x ja päeva x – l vahel (l = kontrollimistevahelise ajavahemiku pikkus, tavaliselt üks päev). Keskmine arengu kiirus nõu kohta (*x*) arvutatakse järgmise võrrandi alusel:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

kus:

$\bar{x}$ – keskmine arengu kiirus nõu i kohta

i – kontrollivahemiku indeks

m – kontrollivahemike maksimaalne arv

f_i – kontrollivahemikul i välja arenenud sääskede arv

n_e – katse lõpuks välja arenenud sääskede koguarv ($=\sum f_i$)

x_i – ajavahemikul i välja arenenud sääskede arengu kiirus

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

kus:

day_i ($päev_i$) – kontrolli päev (lisamisest möödunud päevade arv)

l_i – kontrolli vahemiku pikkus i (päevades, tavaliselt üks päev).

Katseprotokoll

52. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine:

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (lahustuvus vees, aururõhk, jaotustegur mullas (või settes, kui see on määratud), stabiilsus vees jne);

— kemikaali tunnusandmed (üldkasutatav nimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sh puhtus ja uuritava aine kvantitatiivse analüüsi meetod.

Katseorganismi liik:

— kasutatud katseloom: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;

— teave munamasside ja vastsete käsitlemise kohta;

— katseloomade vanus katsenõudesse sisestamise ajal.

Katsetingimused:

— kasutatud sete, s.o looduslik või spetsiaalselt koostatud sete;

— loodusliku sette puhul setteproovi võtmise koha asukoht ja kirjeldus, sh võimaluse korral saastumise ajalugu; omadused: pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria (kui see on asjakohane);

— spetsiaalselt koostatud sette valmistamine: koostisosad ja omadused (orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, niiskus jne katse alguses);

— katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (hapnikusisaldus, pH, elektrijuhtivus, karedus jne katse alguses);

— settekihi ja katva veekihi paksus;

— katva veekihi ja poorivee maht; märja sette kaal koos pooriveega ja ilma selleta;

▼M4

— katsenõud (materjal ja suurus);

— sette rikastamise meetod: kasutatud uuritava kemikaali kontsentratsioonid, paralleelproovide arv ja lahusti kasutamine, kui seda tehti;

— rikastatud sette-vee süsteemi stabiliseerimise tasakaaluoleku faas; kestus ja tingimused;

— inkubatsioonitingimused: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus, aereerimine (sagedus ja intensiivsus);

— üksikasjalik teave söötmise kohta, sh sööda tüüp, valmistamine, kogus ja söötmise ajakava.

Tulemused:

— nominaalsed katsekontsentratsioonid, mõõdetud katsekontsentratsioonid ja kõigi nende analüüside tulemused, millega määrati uuritava aine kontsentratsiooni katsenõus;

— vee kvaliteet katsenõus, s.o pH, temperatuur, lahustunud hapnik, karedus ja ammoniaak;

— aurustunud katsevee asendamine, kui seda tehti;

— väljaarenenud isas- ja emassääskede arv iga nõu ja iga päeva kohta;

— iga nõu kohta nende vastsete arv, kellest sääski ei arenenud;

— vastsete keskmine individuaalne kuivmass iga nõu ja kasvujärgu kohta, kui see on asjakohane;

— valmikute väljaarenemise protsent iga paralleelproovi ja katsekontsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);

— täielikult välja arenenud sääskede keskmine arengu kiirus iga paralleelproovi ja katsekontsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);

— mürgisuse näitajate hinnangud, näiteks EC_x (ja selle usaldusvahemik), täheldatava toimeta kontsentratsioon ja/või vähim täheldatava toimega kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;

— tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise võimalik mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Käesoleva lisa katsemeetod C.8 „Toksilisus vihmaussidele".

15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

1. liide

MÕISTED

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse järgmisi mõisteid järgmises tähenduses:

spetsiaalselt koostatud sete (ehk taastatud, tehislik või sünteetiline sete) – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks;

kattev veekiht – vesi, mis pannakse katsenõus sette peale;

poorivesi – sette- või mullaosakeste vahelises ruumis olev vesi;

rikastatud sete – sete, millele on lisatud uuritavat ainet;

uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4

2. liide

***Chironomus riparius*'e kasvatamist käsitlevad soovitused**

1. *Chironomus*'e vastseid võib kasvatada kristallisatsiooninõus või suuremas mahutis. Mahuti põhi kaetakse ligikaudu 5–10 mm paksuse peene kvartsliiva kihiga. Diatomiit (näiteks Merck, Art 8117) on samuti tõendatult sobiv substraat (piisab õhemast kihist, isegi mõnest millimeetrist). Seejärel lisatakse sobivat vett mitme cm paksuse kihina. Vett tuleks vajaduse korral lisada aurumiskadude asendamiseks ja kuivamise vältimiseks. Vee võib vajaduse korral välja vahetada. Tuleks tagada kerge aereerimine. Vastsete kasvatamise nõusid tuleks hoida vastavas puuris, millega takistatakse väljaarenenud täiskasvanud isendite väljapääsu. Puur peaks olema piisavalt suur, et võimaldada väljaarenenud valmikute parvedesse kogunemist, vastasel juhul ei pruugi toimuda paljunemist (miinimumsuurus on ligikaudu 30 × 30 × 30 cm).

2. Puure tuleks hoida toatemperatuuril või püsiva keskkonnaga ruumis temperatuuril 20 ± 2 °C 16-tunnise valgustusperioodiga (intensiivsus ligikaudu 1 000 luksi) ja kaheksa tunni pimedusega. On teada, et vähem kui 60 %-line suhteline õhuniiskus võib paljunemist takistada.

Lahjendusvesi

3. Võib kasutada mis tahes looduslikku või sünteetilist vett. Enamasti kasutatakse kaevuvett, deklooritud kraanivett ja tehislikke kasvukeskkondi (näiteks Elendti kasvukeskkond M4 või M7, vt allpool). Vett tuleb enne kasutamist aereerida. Vajaduse korral võib kultuuri kasvuvett uuendada, eemaldades kasutatud vee kultuuri kasvunõudest ettevaatlikult valamise teel või sifooniga, kahjustamata vastsete kestasid.

Vastsete söötmine

4. *Chironomus*'e vastseid tuleks sööta helbelise kalasöödaga (TetraMin®, TetraPhyll® või muu samalaadne kaubanduslik kalasööda tootemark) koguses ligikaudu 250 mg nõu kohta päevas. Sööta võib anda kuiva jahvatatud pulbrina või suspensioonina vees: 1,0 g helbelist kalasööta lisatakse 20 ml lahjendusveele ja see segatakse homogeense segu saamiseni. Seda preparaati võib sööta koguses 5 ml nõu kohta päevas (preparaati tuleks enne kasutamist loksutada). Vanemad vastsed võivad vajada rohkem sööta.

5. Söötmist kohandatakse vee kvaliteediga. Kui kultuuri kasvukeskkond muutub häguseks, tuleks sööda hulka vähendada. Sööda lisamist tuleb hoolikalt jälgida. Liiga vähe sööta põhjustab vastsete rände veesamba suunas ning liiga palju sööta hoogustab mikroobide tegevust ja vähendab vee hapnikusisaldust. Mõlemad tingimused võivad vähendada kasvu kiirust.

6. Uute kultuuri kasvunõude valmisseadmisel võib lisada ka mõne rohevetika (näiteks *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) rakke.

Väljaarenenud valmikute söötmine

7. Mõned teadlased on soovitanud väljaarenenud valmikute söötmiseks kasutada küllastunud sahharoosilahuses niisutatud puuvillast lappi.

▼M4

Väljaarenemine

8. Ligikaudu 13–15 päeva möödumisel hakkavad temperatuuril 20 ± 2 °C vastsete kasvatamise nõudest väljuma valmikud. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.

Munamassid

9. Kui valmikud on paljundamispuuris, tuleks kõiki vastsete kasvatamise nõusid kontrollida kolm korda nädalas sinna želatiinjate munamasside lisandumise suhtes. Kui leitakse munamass, tuleks see hoolikalt kõrvaldada. See tuleks üle kanda väiksele tassile, mis sisaldab paljundusvee proovi. Munamasse kasutatakse uue kasvunõu kasutusele võtmiseks (näiteks 2–4 munamassi nõu kohta) või mürgisuse katsetes.

10. Esimese kasvujärgu vastsed peaksid kooruma 2–3 päeva pärast.

Uute kasvunõude ülesseadmine

11. Kui kultuurid on loodud, peaks iga nädal (või katsenõuetest olenevalt väiksema sagedusega) olema võimalik vastsete uute kasvunõude ülesseadmine, kõrvaldades vanemad nõud pärast täiskasvanud sääskede väljaarenemist. Seda süsteemi kasutades saadakse minimaalse vaevaga regulaarne valmikute varu.

Katselahuste M4 ja M7 valmistamine

12. Elendt (1990) on kirjeldanud kasvukeskkonda M4. Kasvukeskkond M7 valmistatakse samal viisil kui kasvukeskkond M4, v.a tabelis 1 nimetatud ainete puhul, mille kontsentratsioon kasvukeskkonnas M7 on kasvukeskkonnaga M4 võrreldes neli korda väiksem. Kasvukeskkonda M7 käsitlev artikkel on kirjutamisel (Elendt, isiklik teade). Katselahust ei tohiks koostada Elendti ja Biasi (1990) järgi, kuna põhilahuste valmistamiseks ei ole antud $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, K_2HPO_4 ja K_2HPO_4 kontsentratsioon sobiv.

Kasvukeskkonna M7 valmistamine

13. Iga põhilahus (I) valmistatakse eraldi ja kombineeritud põhilahus (II) valmistatakse kõnealustest põhilahustest (I) (vt tabel 1). Kasvukeskkonna M7 valmistamiseks võetakse 50 ml kombineeritud põhilahust (II), lisatakse iga makrotoitaine põhilahuse kogused, mis on esitatud tabelis 2 ja täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse deioniseeritud veele kolme vitamiini, nagu on näidatud tabelis 3, ja lõplikule M7 kasvukeskkonnale lisatakse vahetult enne selle kasutamist 0,1 ml kombineeritud vitamiinide põhilahust. (Vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena). Kasvukeskkonda aereeritakse ja see stabiliseeritakse.

KIRJANDUS

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tabel 1

Kasvukeskkondade M4 ja M7 mikroelementide põhilahused

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need 1 liitrini deioniseeritud veega		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Need ained on M4 ja M7 puhul erinevad, nagu on eespool viidatud.
(2) Need lahused valmistatakse eraldi, valatakse seejärel kokku ja autoklaavitakse viivitamata.

Tabel 2

Kasvukeskkondade M4 ja M7 makrotoitainete põhilahused

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkondade M4 ja M7 valmistamiseks lisatav makrotoitainete põhilahuste kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabel 3

Kasvukeskkondade M4 ja M7 vitamiinide põhilahus. Vitamiinide ühe põhilahuse valmistamiseks valatakse kokku kõik kolm vitamiinilahus

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkondade M4 ja M7 valmistamiseks lisatav vitamiinide põhilahuse kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinvesinikkloriid	750	0,1	0,075
Tsüanokobalamiin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiin	7,5	0,1	0,00075

KIRJANDUS

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

3. liide

SPETSIAALSELT KOOSTATUD SETTE VALMISTAMINE

Sette koostis

Spetsiaalselt koostatud sette koostis peaks olema järgmine:

Koostisosa	Kirjeldus	Sette kuivmassi protsent
Turvas	Turbasamblaturvas, mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0, nähtavad taimeosad puuduvad, peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) ja õhu käes kuivatatud	4–5
Kvartsliiv	Tera suurus: > 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisisaldus ≥ 30 %	20
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 (±0,5)
Kaltsiumkarbonaat	$CaCO_3$, pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas	0,05–0,1
Vesi	Juhtivus ≤ 10 μS/cm	30–50

Valmistamine

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Valmistatakse vajaliku turbapulbrikoguse suspensioon deioniseeritud vees, kasutades tõhusat homogenisaatorit. Selle suspensiooni pH reguleeritakse $CaCO_3$ abil vahemikku 5,5 ± 0,5. Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks päeva temperatuuril 20 ± 2 °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent; pH mõõdetakse uuesti ja see peaks olema 6,0 ± 0,5. Seejärel segatakse turba suspensioon muude koostisosadega (liiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH mõõdetakse uuesti ja see reguleeritakse vajaduse korral $CaCO_3$ abil vahemikku 6,5–7,5. Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Enne, kui spetsiaalselt koostatud setet kasutatakse surusääsklastele mürgisuse katses, on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus.

Säilitamine

Tehisliku sette valmistamiseks kasutatavaid kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Spetsiaalselt koostatud (märga) setet ei tohiks enne selle katses kasutamist säilitada. Seda tuleks kasutada viivitamata pärast seitsmepäevast kohandamisperioodi, millega selle valmistamine lõpetatakse.

KIRJANDUS

Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

4. liide

Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Karedus $CaCO_3$-na	< 400 mg/l (*)
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

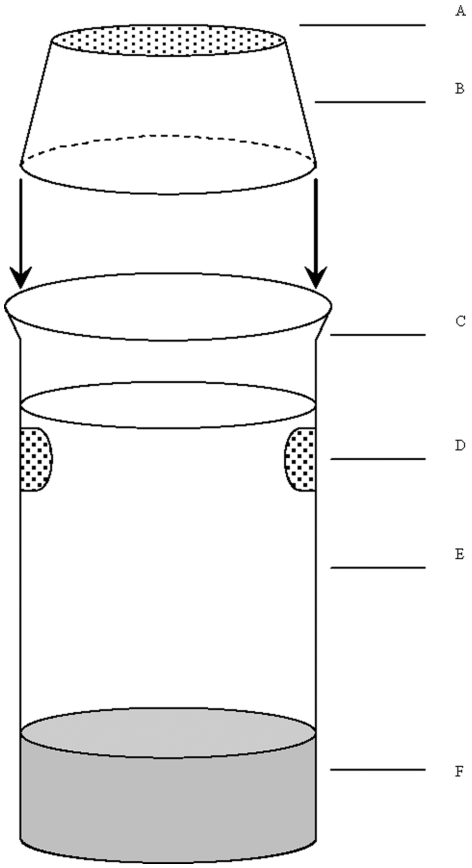
(*) Kui kahtlustatakse karedust tekitavate ioonide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks nimetatud olukorras kasutada Elendti kasvukeskkonda M4).

▼**M4**

5. liide

Suunised surusääsklaste vastsete valmikuteks väljaarenemise seireks

Katsenõudele paigaldatakse väljaarenenud valmikute püüdurid. Neid püüdureid vajatakse alates 20. päevast kuni katse lõpuni. Kasutatava püüduri näidis on esitatud allpool.



A – nailonvõrk

B – tagurpidi pööratud plastiktopsid

C – tilata kokkupuutenõu

D – sõelaga kaetud veevahetusavad

E – vesi

F – sete

▼M4

C.28. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD VEE KASUTAMISEGA

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 219 (2004). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata pikaajalise kemikaalidega kokkupuute mõju settes elavatele magevee kahetiivaliste (*Chironomus* sp.) vastsetele. See põhineb peamiselt BBA suunisel, milles kasutatakse sette-vee katsesüsteemi tehisliku mullaga ning veesamba kokkupuute stsenaariumiga (1). Selles võetakse samuti arvesse *Chironomus riparius'*e ja *Chironomus tentans'*i kohta olemas olevaid mürgisuse määramise katse-eeskirju, mis on koostatud Euroopas ja Põhja-Ameerikas (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) ning mille puhul on tehtud laboritevahelised võrdluskatsed (1, 6, 9). Võib kasutada ka muid hästi dokumenteeritud surusääsklaste liike, näiteks *Chironomus yoshimatsui'*d (10, 11).

2. Käesolevas katsemeetodis kasutatud kokkupuutestsenaarium on vee rikastamine. Sobiva kokkupuutestsenaariumi valimine oleneb katse kavandatud eesmärgist. Vee kokkupuutestsenaarium, mis hõlmab veesamba rikastamist, on kavandatud simuleerima pihustatud pestitsiidide hõljumist ja hõlmab esialgseid maksimaalseid kontsentratsioone poorivees. See on kasulik ka muud tüüpi kokkupuudete puhul (sh keemilised lekked), v.a katseperioodist pikemate kogunemisprotsesside puhul.

3. Ained, mille kohta on vaja teha katsed settes elavate organismidega, jäävad tavaliselt sellesse keskkonda pikaks ajaks püsima. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga mitmel viisil kokku puutuda. Iga kokkupuutetee suhteline tähtsus ja aeg, mis on iga kokkupuutetee puhul vajalik üldisse mürgisusse panuse andmiseks, sõltub asjaomase kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Tugevasti adsorbeeruvate ainete (näiteks log K_{ow} > 5) või settega kovalentseid sidemeid moodustavate ainete puhul võib tähtis kokkupuutetee olla manustamine saastunud toiduga. Väga lipofiilsete ainete mürgisuse alahindamise vältimiseks võib kaaluda settele sööda lisamist enne uuritava aine kasutamist. Kõigi võimalike kokkupuuteteede arvessevõtmiseks on käesolevas katsemeetodis keskendutud pikaajalisele kokkupuutele. *C. riparius'*e ja *C. yoshimatsui* puhul kestab katse 20–28 päeva ning *C. tentans'*i puhul 28–65 päeva. Kui konkreetsel põhjusel vajatakse andmeid lühema aja kohta, näiteks ebastabiilse kemikaali mõju uurimiseks, võib kümnepäevase ajavahemiku järel võtta täiendavad paralleelproovid.

4. Mõõdetavad näitajad on vastsetest arenenud valmikute koguarv ja nende arenemiseks vajalik aeg. Vastsete elulemust ja kasvu soovitatakse mõõta alles pärast kümnepäevase ajavahemiku möödumist; kui lisaks vajatakse andmeid lühema aja kohta, kasutatakse vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid.

5. Soovitatakse kasutada spetsiaalselt koostatud setet. Spetsiaalselt koostatud settel on loodusliku sette ees mitmeid eeliseid:

   — väheneb katsete hajuvus, kuna nii saadakse reprodutseeritav standardiseeritud maatriks ja kõrvaldatakse vajadus saastumata ja puhaste setteallikate leidmiseks;

   — katseid võib alustada ükskõik millal, ei tule arvestada katse setete hooajalist muutlikkust ja setet ei ole vaja eeltöödelda kohaliku fauna kõrvaldamiseks; spetsiaalselt koostatud sette kasutamine vähendab samuti korrapäraseks katsetamiseks kohapeal piisavas koguses sette kogumisega seotud kulusid;

▼M4

— spetsiaalselt koostatud sette kasutamine võimaldab mürgisust võrrelda ja selle põhjal aineid järjestada: mürgisuse andmed looduslike ja tehislike setetega tehtud katsetest olid mitme kemikaali puhul võrreldavad (2).

6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

7. Kõigepealt puutuvad surusääsklaste esimese kasvujärgu vastsed kokku sette-vee süsteemis teatavas kontsentratsioonivahemikus oleva uuritava ainega. Katse alguses pannakse esimese kasvujärgu vastsed katsenõudesse, mis sisaldavad sette-vee süsteemi, ja seejärel lisatakse uuritav aine vette (vesi „rikastatakse" uuritava ainega). Katse lõpus mõõdetakse surusääsklaste väljaarenemise määra ja arengu kiirust. Vastsete elulemust ja massi võib vajaduse korral mõõta ka kümne päeva möödumisel (kasutades vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid). Neid andmeid analüüsitakse kas regressioonimudeli abil, et hinnata kontsentratsioon, mis põhjustab valmikute väljaarenemise või vastsete elulemuse või kasvu x % vähenemise (näiteks EC_{15}, EC_{50} jne), või kasutades täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni määramiseks statistilise hüpoteesi testimise meetodit. Viimati nimetatud juhul tuleb täheldatud mõju väärtusi võrrelda statistiliste testide abil kontrollkatses määratud väärtustega.

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

8. Teada peaks olema uuritava aine lahustuvus vees, aururõhk, mõõdetud või arvutatud jaotumine settesse ning stabiilsus vees ja settes. Kättesaadav peaks olema usaldusväärne analüüsimeetod uuritava aine kvantitatiivseks määramiseks katvas veekihis, poorivees ja settes; meetodi täpsus ja määramispiir peaksid olema teada. Kasulik on teada uuritava aine struktuurivalemit ja puhtust. Samuti on kasulik teada uuritava aine keemilist käitumist (näiteks hajumine, abiootiline ja biootiline lagunemine jne). Täiendavad juhised selliste ainete mõju uurimiseks, mille füüsikalis-keemilised omadused raskendavad selle katse tegemist, on esitatud (12).

VÕRDLUSKEMIKAALID

9. Võrdluskemikaale võib katsetada regulaarselt, et tagada katse-eeskirjade ja katsetingimuste täitmise usaldusväärsus. Laboritevahelistes võrdlustes ja valideerimisuuringutes edukalt kasutatud võrdlustoksikandid on näiteks: lindaan, trifluraliin, pentaklorofenool, kaadmiumkloriid ja kaaliumkloriid (1, 2, 5, 6, 13).

KATSE KEHTIVUS

10. Katse kehtivuse tõendamisel arvestatakse järgmist:

— kontrollnõus peab katse lõpuks välja arenema vähemalt 70 % putukaid (1, 6);

— *C. riparius'*e ja *C. yoshimatsui* valmikute väljaarenemine kontrollnõudes peaks toimuma 12–23 päeva jooksul pärast nende viimist nõudesse; *C. tentans'*i puhul on vajalik ajavahemik 20–65 päeva;

— katse lõpus tuleks igas nõus mõõta pH ja lahustunud hapniku kontsentratsioon. Hapnikukontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest kasutataval temperatuuril ja katva veekihi pH peaks kõigis katsenõudes olema vahemikus 6–9;

▼M4

— vee temperatuur ei tohiks erineda rohkem kui ±1,0 °C võrra. Vee temperatuuri on võimalik kontrollida isotermilise ruumi abil ja sel juhul peaks ruumi temperatuur olema sobivate ajavahemike järel kinnitatud.

MEETODI KIRJELDUS

Katsenõud

11. Uuring tehakse 600 ml klaasist katsenõudega, mille läbimõõt on 8 cm. Muud nõud on sobivad, kuid need peaksid tagama katva veekihi ja sette vajaliku paksuse. Sette pind peaks olema piisav, et tagada vastse kohta 2–3 cm^2. Settekihi paksuse ja katva veekihi paksuse suhe peaks olema 1 : 4. Katsenõud ja muud seadmed, mis katsesüsteemiga kokku puutuvad, peaksid olema valmistatud täies ulatuses klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist (näiteks teflonist).

Liigi valimine

12. Katses kasutatav liik on eelistatavalt *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* on samuti sobiv, aga selle käsitlemine on keerukam ja see nõuab pikemat katseperioodi. *Chironomus yohimatsui* kasutamine on samuti võimalik. 2. liites on esitatud andmed *Chironomus riparius'*e kultuuri kasvatamise meetodite kohta. Ka muude liikide, nagu *Chironomus tentans'*i (4) ja *Chironomus yoshimatsui* (11) kultuuri kasvatamise tingimused on avaldatud. Enne katset tuleb kinnitada liigi määramist, aga seda ei nõuta enne iga katset, kui organismid pärinevad asutusesisesest kultuurist.

Sete

13. Eelistatavalt tuleks kasutada spetsiaalselt koostatud setet (mida nimetatakse ka taastatud, tehislikuks või sünteetiliseks setteks). Loodusliku sette kasutamise korral tuleks seda iseloomustada (vähemalt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, samuti on soovitatav määrata muud parameetrid, nagu süsinikulämmastiku suhe ja granulomeetria) ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid ega muid organisme, kes võiksid surusääsklastega konkureerida või neid süüa. Enne loodusliku sette kasutamist surusääsklastel avalduva mürgisuse katses on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus. Käesolevas katses soovitatakse kasutada järgmist spetsiaalselt koostatud setet, mis põhineb katsemeetodis C.8 (14) kasutataval tehismullal (1, 15, 16):

a) 4–5 % (kuivmass) turvast: pH väärtus võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; tähtis on kasutada peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) pulbrilist turvast, mida on kuivatatud ainult õhu käes;

b) 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (kaoliniidisisaldus eelistatavalt üle 30 %);

c) 75–76 % (kuivmass) kvartsliiva (see peaks peamiselt koosnema peenest liivast ja rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm);

d) lõplikus segus niiskusesisalduse 30–50 % saamiseks lisatakse deioniseeritud vett;

e) sette lõpliku segu reguleerimiseks pH vahemikku 7,0 ± 0,5 lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$);

f) Lõpliku segu orgaanilise süsiniku sisaldus peaks olema 2 % (±0,5 %) ja see tuleks õigeks seada sobivas koguses turba ja liiva kasutamisega kooskõlas alapunktidega a ja c.

▼M4

14. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada. Sette koostisosi tuleks kontrollida, et tõendada keemilise saaste puudumine (näiteks raskmetallid, kloororgaanilised ühendid, fosfororgaanilised ühendid jne). Spetsiaalselt koostatud sette valmistamise näidis on esitatud 3. liites. Kuivade koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast katva veekihi lisamist ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste hõljumist) ja et turvas või sete on piisavalt konditsioneerunud.

Vesi

15. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 2. ja 4. liites esitatud lahjendamiseks kasutatava vee nõutavatele keemilistele omadustele. Kasvuveena ja katseveena lubatakse kasutada iga sobivat vett, looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett (vt 2. liide) või deklooritud kraanivett, kui surusääsklased jäävad selles kasvatamise ja katsetamise ajal ellu ega ilmuta stressi tunnuseid. Katse alguses peaks katsevee pH olema vahemikus 6–9 ja vee summaarne karedus ei tohiks olla suurem kui 400 mg/l $CaCO_3$-na. Kui oletatakse karedust tekitavate ioonide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada siiski väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks sel juhul kasutada Elendti kasvukeskkonda M4). Kogu uuringu vältel tuleks kasutada sama tüüpi vett. 4. liites loetletud vee kvaliteedi omadusi tuleks mõõta vähemalt kaks korda aastas või siis, kui kahtlustatakse, et kõnealused omadused võivad olla oluliselt muutunud.

Põhilahused – rikastatud vesi

16. Katsekontsentratsioonid arvutatakse veesambas olevate kontsentratsioonide alusel, s.o setet katva veekihi alusel. Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks on soovitatav lahustada uuritav aine katsekeskkonnas. Mõnel juhul võib sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks olla vajalik lahusti või dispergendi kasutamine. Sobivad lahustid on atsetoon, etanool, metanool, etüleenglükoolmonometüüleeter, etüleenglükooldimetüüleeter, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergendid on Cremophor RH40, Tween 80, metüültselluloos (0,01 %) ja HCO-40. Solubiliseeriva aine kontsentratsioon lõplikus katse kasvukeskkonnas peaks olema minimaalne (s.o $\leq$ 0,1 ml/l) ja see peaks olema sama kõigi töötlemiste puhul. Solubiliseeriva aine kasutamisel ei tohi sellel olla märkimisväärset mõju surusääsklaste vastsete elulemusele ega märgatavat negatiivset mõju surusääsklaste vastsetele, mida saab täheldada üksnes lahustiga tehtava kontrollkatse abil. Siiski tuleks teha kõik, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

KATSE KAVANDAMINE

17. Katse kavandamine hõlmab katse kontsentratsioonide arvu ja vahemike valimist, iga kontsentratsioonitaseme jaoks nõude arvu ning igas nõus olevate vastsete arvu valimist. Kirjeldatud on, kuidas hinnata EC-punktide väärtusi ja täheldatava toimeta kontsentratsiooni ning teha piirsisalduskatset. Regressioonanalüüs on eelistatav statistilise hüpoteesi kontrollimise lähenemisviisile.

Regressioonanalüüsi kavandamine

18. Katses kasutatavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama toimet avaldavat kontsentratsiooni (nt EC_{15}, EC_{50}) ja uuritava aine puhul huvi pakkuvat kontsentratsioonivahemikku. Tavaliselt paraneb toimet avaldavate kontsentratsioonide (EC_x) hinnangute täpsus ja eelkõige kehtivus, kui toimet avaldav

▼M4

kontsentratsioon on uuritud kontsentratsioonide vahemikus. Tuleks vältida suurt ekstrapoleerimist allapoole väikseimat positiivset kontsentratsiooni või ülespoole suurimat kontsentratsiooni. Eelnev annusevahemiku leidmise katse aitab valida kasutatavat kontsentratsioonivahemikku (vt punkt 27).

19. Kui tuleb hinnata EC_x, tuleks katse teha vähemalt viie kontsentratsiooniga ja iga kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada kolme paralleelkatset. Igal juhul on mudeli korraliku hindamise jaoks soovitatav kasutada piisavaid uuritavaid kontsentratsioone. Kontsentratsioonidevaheline kordaja ei tohiks olla suurem kui 2 (erandi võib teha juhul, kui doosi mõju graafiku tõus on madal). Iga doosi paralleelkatsete arvu võib vähendada, kui suurendatakse eri mõjuga uuritavate kontsentratsioonide arvu. Paralleelkatsete arvu suurendamine või uuritavate kontsentratsioonide vahemiku vähendamine enamasti vähendab usaldusvahemikku. Kui on vaja hinnata vastsete elulemust ja kasvu kümne päeva järel, on vaja võtta täiendavaid paralleelproove.

Täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni hindamise kavandamine

20. Kui hinnatakse täheldatava toimeta kontsentratsiooni või vähimat täheldatava toimega kontsentratsiooni, tuleks kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni vähemalt nelja paralleelkatsega ja kõnealuseid kontsentratsioone eraldav kordaja ei tohiks olla suurem kui 2. Paralleelkatsete arv peaks olema piisav, et tagada piisav statistiline võimsus, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ($p = 0,05$). Arengu kiiruse puhul on üldiselt asjakohane variatsioonanalüüs (ANOVA), näiteks Dunnetti test ja Williamsi test (17, 18, 19, 20). Väljaarenemise suhte puhul võib kasutada Cochrani-Armitage'i testi, Fisheri täpset testi (Bonferroni parandusega) või Manteli-Haenszeli testi.

Piirsisalduskatse

21. Kui esialgsetes annusevahemiku leidmise katsetes tulemusi ei saadud, võib teha piirsisalduskatse (üks katsekontsentratsioon ja kontroll). Piirsisalduskatse eesmärk on näidata, et uuritava aine mürgine kontsentratsioon on katsetatud piirkontsentratsioonist suurem. Käesolevas katsemeetodis soovituslikku kontsentratsiooni ei esitata; see jäetakse reguleerivate asutuste otsustada. Enamasti tuleb nii töötlus- kui ka kontrollseadmetega teha vähemalt kuus paralleelkatset. Tuleks tõendada piisava statistilise võimsuse olemasolu, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ($p = 0,05$). Mõõdetavate suuruste (arengu kiirus ja kaal) puhul, kui andmed vastavad käesoleva katse nõuetele (normaalsus, ühtlane hajumine), on asjakohane statistiline meetod t-kriteerium. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mittevõrdse hajumise t-kriteeriumi või mitteparameetrilist testi, näiteks Wilcoxoni-Manni-Whithey testi. Valmikute väljaarenemise suhte puhul on asjakohane kasutada Fisheri täpset testi.

KATSE KÄIK

Kokkupuutetingimused

Rikastatud vee-sette süsteemi valmistamine

22. Katsenõudesse lisatakse vähemalt 1,5 cm kihi tekitamiseks vajalik kogus spetsiaalselt koostatud setet (vt punktid 13-14 ja 3. liide). Vett lisatakse 6 cm paksuse kihini (vt punkt 15). Settekihi ja veekihi paksuse suhe ei tohiks ületada 1 : 4 ja settekihi paksus ei tohiks olla suurem kui 3 cm. Sette-vee süsteem tuleks jätta enne katseorganismide lisamist seitsmeks päevaks kerge aeratsiooni tingimustesse (vt punkt 14 ja 3. liide). Sette osade eraldumise ja veesambas katsevee lisamisel peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta vee valamise ajal plastikkettaga, mis pärast vee valamist kohe eemaldatakse. Võib kasutada ka muid võtteid.

▼M4

23. Katsenõud peaksid olema kaetud (näiteks klaasplaadiga). Vajaduse korral lisatakse vee aurumise kompenseerimiseks ja uuringu algse veetaseme saavutamiseks vett. Soolade kogunemise vältimiseks tuleks lisada destilleeritud või deioniseeritud vett.

Katseorganismide lisamine

24. Neli kuni viis päeva enne katseorganismide lisamist katsenõudesse tuleks võtta kultuuridest munamassid ja asetada need väikestesse nõudesse kultuuri kasvukeskkonnas. Võib kasutada varukultuuri vana kasvukeskkonda või värskelt valmistatud kasvukeskkonda. Viimati nimetatu kasutamisel tuleks lisada kultuuri kasvukeskkonnale väikses koguses sööta, näiteks rohevetikaid ja/või paar tilka peeneks jahvatatud helbelise kalasööda suspensiooni filtraadist (vt 2. liide). Tuleks kasutada ainult värskelt munetud munamasse. Tavaliselt hakkavad vastsed kooruma paari päeva möödumisel munade munemisest (2–3 päeva *Chironomus riparius'*e puhul temperatuuril 20 °C ning 1–4 päeva *Chironomus tentans'*i puhul temperatuuril 23 °C ja *Chironomus yoshimatui* puhul temperatuuril 25 °C) ja vastsed kasvavad neljas kasvujärgus, millest iga kasvujärk kestab 4–8 päeva. Katses tuleks kasutada esimese kasvujärgu vastseid (2–3 või 1–4 päeva pärast koorumist). Sääskede kasvujärke on võimalik kontrollida peakapsli laiuse mõõtmisega (6).

25. Tõmbi pipeti abil jaotatakse 20 esimese kasvujärgu vastset juhuslikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad rikastatud setet ja vett. Vee aereerimine tuleb vastsete katsenõudesse lisamise ajal peatada ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist (vt punktid 24 ja 32). Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatud vastsete arv kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni (EC-punkti) hindamise korral vähemalt 60 ja täheldatava toimeta kontsentratsiooni määramise korral 80.

26. 24 tundi pärast vastsete lisamist rikastatakse uuritavat ainet katva veekihi sambasse ja alustatakse uuesti kerget aereerimist. Uuritava aine lahuseid lisatakse pipeti abil väikses koguses veepinna alla. Seejärel tuleks kattev veekiht ilma setet mõjutamata ettevaatlikult segada.

Uuritavad kontsentratsioonid

27. Annusevahemiku leidmise katse võib aidata kindlaks teha lõpliku katse kontsentratsioonivahemikke. Selleks kasutatakse uuritava aine laiade vahedega kontsentratsioonide seeriat. Lõplikus katses kasutatavaga sama pindtiheduse tagamiseks iga surusääsklase kohta puutuvad surusääsklased kokku uuritava aine iga kontsentratsiooniga sellise ajavahemiku vältel, mis võimaldab hinnata asjakohaseid katsekontsentratsioone; paralleelproovid ei ole vajalikud.

28. Lõpliku katse kontsentratsioonid määratakse kindlaks annusevahemiku leidmise katse tulemuse alusel. Tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja need tuleks valida nii, nagu on kirjeldatud punktides 18–20.

Kontrollkatsed

29. Katse peaks hõlmama vajalikku arvu paralleelseid settega kontrollkatsenõusid, milles ei ole uuritavat ainet (vt punktid 19-20). Kui uuritava aine lisamiseks on kasutatud lahustit (vt punkt 16), tuleks teha settele lahusti lisamise kontrollkatse.

▼M4

Katsesüsteem

30. Kasutatakse staatilisi süsteeme. Erandjuhul võib kasutada poolstaatilisi või läbivooluga süsteeme koos katva veekihi vahelduva või pideva uuendamisega, näiteks kui vee kvaliteet ei ole katseorganismile enam sobiv või mõjutab kemikaali tasakaaluolekut (näiteks lahustunud hapniku tase langeb liiga madalale, väljutatud saaduste kontsentratsioon muutub liiga suureks või settest leostuvad mineraalained, mis mõjutavad pH-d ja/või vee karedust). Tavaliselt on siiski piisavad ja eelistatavad muud katva veekihi kvaliteedi parandamise meetodid, näiteks aereerimine.

Sööt

31. Vastseid tuleb sööta eelistatavalt iga päev või vähemalt kolm korda nädalas. Kalasööt (suspensioon vees või peeneks jahvatatud sööt, näiteks TetraMin või TetraPhyll; vt andmed, 2. liide) koguses 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui* puhul) vastse kohta päevas näib olevat esimese kümne päeva jooksul noorte vastsete jaoks piisav. Vanemad vastsed võivad vajada mõnevõrra rohkem sööta: 0,5–1 mg vastse kohta päevas peaks olema piisav ülejäänud katse vältel. Söödakogust tuleks vähendada kõigi kokkupuute- ja kontrollkatsete puhul, kui täheldatakse seente kasvu või kui kontrollkatses täheldatakse suremust. Kui seente kasvu ei ole võimalik peatada, tuleb katset korrata. Kui katseid tehakse tugevalt adsorbeeruva ainega (näiteks log K_{ow} > 5) või settega kovalentseid sidemeid tekitava ainega, võib enne stabiliseerumise ajavahemikku lisada spetsiaalselt koostatud settele sellise söödakoguse, mis on vajalik organismide elulemuse ja loodusliku kasvu tagamiseks. Selleks tuleb kasutada kalasööda asemel taimset materjali, näiteks võib kasutada 0,5 % (kuivmass) kõrvenõgese (*Urtica dioica*), mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) peeneks jahvatatud lehti või muud taimset materjali (*Cerophyl* või alfatselluloos).

Inkubeerimistingimused

32. Eelistatavalt 24 tundi pärast vastsete lisamist hakatakse katsenõudes katvat veekihti kergelt aereerima, mida jätkatakse kogu katse vältel (tuleb olla hoolikas, et lahustunud hapniku kontsentratsioon ei langeks alla 60 % hapniku küllastuskontsentratsioonist). Aereerimiseks kasutatakse klaasist Pasteuri pipetti, mis on kinnitatud settekihi kohale 2–3 cm kõrgusele (üks või mõni mull sekundis). Lenduva kemikaali katsetamisel võib kaaluda sette-vee süsteemi aereerimisest loobumist.

33. Katse tehakse püsival temperatuuril 20 °C (±2 °C). *C. tentans*'i ja *C. yoshimatui* puhul on soovitatavad temperatuurid vastavalt 23 °C ja 25 °C (±2 °C). Kasutatakse 16-tunnist valgustusperioodi ja valguse intensiivsus peaks olema 500 kuni 1 000 luksi.

Kokkupuute kestus

34. Kokkupuude algab vastsete lisamisega rikastatud ja kontrollnõudesse. Maksimaalne kokkupuute kestus on 28 päeva *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul ning 65 päeva *C. tentans*'i puhul. Kui sääsed arenevad välja varem, võib katse lõpetada vähemalt viie päeva möödumisel pärast viimase valmiku väljaarenemist kontrollnõus.

VAATLUSED

Väljaarenemine

35. Tehakse kindlaks arengu aeg ja täielikult väljaarenenud isas- ja emassääskede koguarv. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.

▼M4

36. Katsenõusid tuleks vaadelda vähemalt kolm korda nädalas, et hinnata visuaalselt iga ebatavalist käitumist (näiteks settest väljumine, ebatavaline ujumine) kontrollnõuga võrreldes. Oodataval valmikute ilmumise ajal loendatakse sääski iga päev. Registreeritakse täielikult välja arenenud sääskede sugu ja arv. Pärast tuvastamist kõrvaldatakse sääsed nõudest. Enne katse lõpetamist munetud munamassid tuleks registreerida ja seejärel eemaldada, et vältida settesse uute vastsete teket. Samuti registreeritakse nende nähtavate nukkude arv, millest sääsk ei koorunud. Suunised väljaarenemise mõõtmise kohta on esitatud 5. liites.

Kasvamine ja elulemus

37. Kui on vaja esitada andmeid vastsete elulemuse ja kasvu kohta kümne päeva jooksul, tuleks katset alustada suurema arvu nõudega, et neid oleks võimalik seejärel kasutada. Kõnealuste täiendavate nõude setteid sõelutakse vastsete saamiseks 250 μm sõela abil. Surma tuvastamise kriteeriumid on liikumatus või reageerimatus mehaanilisele stiimulile. Vastsed, keda ei õnnestunud kätte saada, tuleks samuti surnuks lugeda (vastsed, kes surid katse alguses, võivad olla juba mikroobide poolt lagundatud). Tehakse kindlaks ellujäänud vastsete (tuhavaba) kuivmass katsenõu kohta ja arvutatakse keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta. Kasulik on määrata, millisesse kasvujärku ellujäänud vastsed kuuluvad; selleks võib mõõta iga isendi peakapsli laiust.

Analüütilised mõõtmised

Uuritava aine kontsentratsioon

38. Katse alguses (eelistatavalt tund aega pärast uuritava aine lisamist) ja lõpus tuleb analüüsida suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil vähemalt katva veekihi, poorivee ja sette proove. Kõnealused uuritava aine kontsentratsiooni määramised annavad teavet uuritava aine käitumise/jaotumise kohta vee-sette süsteemis. Setteproovi võtmine katse alguses võib katsesüsteemi mõjutada (näiteks katse vastsete eemaldamine), seega tuleks analüütiliste näitajate määramiseks kasutada katse alguses ja katse ajal vajaduse korral täiendavaid katsenõusid (vt punkt 39). Sette mõõtmised ei pruugi olla vajalikud, kui uuritava aine jaotumine vee ja sette vahel on võrreldavates tingimustes (näiteks sette ja vee suhe, lisamise tüüp, sette orgaanilise süsiniku sisaldus) tehtud vee/sette uuringu käigus täpselt määratud.

39. Kui tehakse vahepealseid mõõtmisi (näiteks seitsmendal päeval) või kui analüüsi jaoks on vaja suurt proovi, mida ei saa katsenõust ilma katsesüsteemi mõjutamata võtta, tuleks analüüs teha samal viisil töödeldud, kuid bioloogilisteks vaatlusteks mitte kasutatavast täiendavast katsenõust (kus on ka katseorganismid) võetud proovist.

40. Tsentrifuugimine näiteks 10 000 g ja 4 °C juures 30 minuti vältel on soovitatav meetod poorivee eraldamiseks. Kui on tõendatud, et uuritav aine ei adsorbeeru filtritele, võib sobida ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi liiga väikse proovi suuruse tõttu olla võimalik poorivee kontsentratsiooni määramine.

▼M4

Füüsikalis-keemilised parameetrid

41. Katsenõude pH-d, lahustunud hapniku sisaldust katsevees ja temperatuuri tuleks mõõta asjakohasel viisil (vt punkt 10). Katse alguses ja lõpus tuleks kontrollnõudes ja ühes suurima kontsentratsiooniga katsenõus mõõta karedust ja ammoniaaki.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

42. Kõnealuse katse eesmärk on teha kindlaks uuritava aine mõju isas- ja emassääskede arengu kiirusele ja täielikult välja arenenud sääskede koguarvule või kümnepäevase katse korral mõju vastsete elulemusele ja kehamassile. Kui puuduvad andmed sugude statistiliselt erineva tundlikkuse kohta, võib statistilistes analüüsides isaste ja emaste tulemused koondada. Sugude erinevat tundlikkust on võimalik statistiliselt hinnata näiteks χ^2-r × 2 tabeli testi abil. Vajaduse korral tuleb kümne päeva möödumisel teha kindlaks vastsete elulemus ja keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta.

43. Toimet avaldavad kontsentratsioonid, mis põhinevad katva veekihi kontsentratsioonidel, arvutatakse eelistatavalt katse alguses mõõdetud kontsentratsioonide alusel (vt punkt 38).

44. EC_{50} või muu EC_x-näitaja arvutamiseks võib tegelike paralleelproovidena kasutada nõude statistikat. Iga EC_x usaldusvahemiku arvutamisel tuleks arvesse võtta eri nõude tulemuste hajumist või tuleks näidata, et kõnealune hajumine on nii väike, et seda võib eirata. Kui andmeid töödeldakse mudeli parameetrite leidmiseks vähimruutude meetodiga, tuleks nõu statistikat teisendada, et dispersioon oleks ühtlasem. EC_x-väärtused tuleks siiski arvutada pärast tulemuse esialgsele väärtusele tagasiteisendamist.

45. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha hüpoteesi katsetamise abil kindlaks täheldatava toimeta kontsentratsioon / vähim täheldatava toimega kontsentratsioon, tuleb võtta arvesse nõudevahelist hajuvust, näiteks kasutada hierarhilist dispersioonanalüüsi (*nested* ANOVA). Olukorras, kus tavapärased dispersioonanalüüsi (ANOVA) eeldused ei ole täidetud, võivad paremini sobida töökindlamad testid (21).

Väljaarenemise määr

46. Väljaarenemise määrad on kõik-või-mitte-midagi-andmed ja neid on võimalik analüüsida astmeliselt kohaldatava Cochrani-Armitage'i testi abil, kus eeldatakse, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, ja need andmed on selle eeldusega kooskõlas. Vastasel juhul võib kasutada Fisheri täpset testi või Manteli-Haenszeli testi Bonferroni-Holmi kohandatud p-väärtustega. Kui on tõendeid, et ühe kontsentratsiooniga paralleelproovide hajuvus on suurem kui eeldatakse binoomjaotuse dispersiooni puhul (nn ekstra-binoomjaotuse dispersioon), tuleks kasutada töökindlat Cochrani-Armitage'i või Fisheri täpset testi, nagu on soovitatud (21).

47. Määratakse nõu kohta välja arenenud sääskede arv n_e, mis jagatakse lisatud vastsete arvuga n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

kus:

ER = väljaarenemise määr

n_e = nõu kohta välja arenenud sääskede arv

n_a = nõu kohta lisatud vastsete arv.

48. Ekstra-binoomjaotuse dispersiooni korral on suurte valimite puhul kõige asjakohasem alternatiiv käsitleda väljaarenemise määra pideva vastusena ning kasutada selliseid meetodeid nagu Williamsi test, kui võib eeldada, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, kui see on kooskõlas kõnealuste väljaarenemise määra andmetega. Kui monotoonsust ei ole, on asjakohane kasutada Dunnetti testi. Suur valim on siinkohal määratletud kui väljaarenenud sääskede arv ja väljaarenemata jäänud sääskede arv, mis mõlemad on suuremad kui viis paralleelproovi (nõu) kohta.

49. Dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetodite kohaldamiseks tuleks väljaarenemise määra väärtused kõigepealt teisendada arkussiinus-ruutjuure-teisenduse või Freemani-Tukey teisenduse abil, et saada ligikaudne normaaljaotus ja võrdsustada variatsioonid. Cochrani-Armitage'i testi, Fisheri täpse testi (Bonferroni) või Manteli-Haenszeli testi võib kasutada absoluutsete sageduste kasutamisel. Arkussiinus-ruutjuure-teisendust kohaldatakse, arvutades väljaarenemise määra ruutjuure siinuse pöördarvu ($\sin^{-1}$).

50. Väljaarenemise määrade puhul arvutatakse EC_x-väärtused regressioonanalüüsi (või näiteks probit- (22) või logit-teisenduse, Weibulli meetodi, sobiva müügiloleva tarkvara jne) abil. Kui regressioonanalüüs ebaõnnestub (näiteks kui on vähem kui kaks osalist vastust), kasutatakse muid mitteparameetrilisi meetodeid, näiteks libisev keskmine või lihtne interpolatsioon.

Arengu kiirus

51. Keskmine arengu aeg väljendab keskmist ajavahemikku vastsete lisamise (katse päev 0) ja sääskede katsekohordi tekke vahel. (Tegeliku arenguaja arvutamiseks tuleks arvesse võtta vastsete vanust lisamise ajal.) Arengu kiirus on pöördvõrdeline arengu ajaga (ühik: 1/päev) ja väljendab vastsete arengu seda osa, mis toimub ühe päeva jooksul. Kõnealuste sette mürgisuse hindamise uuringute puhul eelistatakse arengu kiirust, kuna selle dispersioon on väiksem, homogeensem kui arenguaja puhul ja lähedasem normaaljaotusele. Seega võib arengu kiiruse puhul kasutada tugevaid parameetrilisi testimismeetodeid, mida ei saa kasutada arenguaja puhul. Arengu kiiruse kui pideva vastuse jaoks saab EC_x-väärtusi hinnata regressioonanalüüsiga (näiteks 23, 24).

52. Järgmiste statistiliste testide puhul eeldatakse, et kontrolli päeval x täheldatud sääsed on välja arenenud keskmisel ajavahemikul päeva x ja päeva x – l vahel (l = kontrollimiste vahelise ajavahemiku pikkus, tavaliselt üks päev). Keskmine arengu kiirus nõu kohta (*x*) arvutatakse järgmise võrrandi alusel:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

kus:

$\overline{x}$ – keskmine arengu kiirus nõu i kohta

i – kontrollivahemiku indeks

m – kontrollivahemike maksimaalne arv

▼M4

f_i –
kontrollivahemikul i välja arenenud sääskede arv

n_e – katse lõpuks välja arenenud sääskede koguarv (= $\sum f_i$)

x_i – ajavahemikul i välja arenenud sääskede arengu kiirus,

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

kus:

day_i ($päev_i$) – kontrolli päev (lisamisest möödunud päevade arv)

l_i – kontrollivahemiku pikkus i (päevades, tavaliselt üks päev).

Katseprotokoll

53. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine:

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (lahustuvus vees, aururõhk, jaotustegur mullas (või settes, kui see on määratud), stabiilsus vees jne);

— kemikaali tunnusandmed (üldkasutatav nimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sh puhtus ja uuritava aine kvantitatiivse analüüsi meetod.

Katseorganismi liik:

— kasutatud katseloom: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;

— teave munamasside ja vastsete käsitlemise kohta;

— katseloomade vanus katsenõudesse sisestamise ajal.

Katsetingimused:

— kasutatud sete, s.o looduslik või spetsiaalselt koostatud sete;

— loodusliku sette puhul setteproovi võtmise koha asukoht ja kirjeldus, sh võimaluse korral saastumise ajalugu; omadused: pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria (kui see on asjakohane);

— spetsiaalselt koostatud sette valmistamine: koostisosad ja omadused (orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, niiskus jne katse alguses);

— katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (hapnikusisaldus, pH, elektrijuhtivus, karedus jne katse alguses);

— settekihi ja katva veekihi paksus;

— katva veekihi ja poorivee maht; märja sette kaal koos pooriveega ja ilma selleta;

— katsenõud (materjal ja suurus);

— põhilahuse valmistamise meetod ja uuritud kontsentratsioonide saamine;

▼M4

— uuritava aine manustamine: kasutatud kontsentratsioonid, paralleelproovide arv ja lahusti kasutamine, kui seda tehti;

— inkubatsioonitingimused: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus, aereerimine (sagedus ja intensiivsus);

— üksikasjalik teave söötmise kohta, sh sööda tüüp, valmistamine, kogus ja söötmise ajakava.

Tulemused:

— nominaalsed katsekontsentratsioonid, mõõdetud katsekontsentratsioonid ja kõigi analüüside tulemused, millega määrati uuritava aine kontsentratsiooni katsenõus;

— vee kvaliteet katsenõus, s.o pH, temperatuur, lahustunud hapnik, karedus ja ammoniaak;

— aurustunud katsevee asendamine, kui seda tehti;

— väljaarenenud isas- ja emassääskede arv iga nõu ja iga päeva kohta;

— iga nõu kohta nende vastsete arv, kellest sääski ei arenenud;

— vastsete keskmine individuaalne kuivmass iga nõu ja kasvujärgu kohta, kui see on asjakohane;

— valmikute väljaarenemise protsent iga paralleelproovi ja katsekontsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);

— täielikult väljaarenenud sääskede keskmine arengu kiirus iga paralleelproovi ja katsekontsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);

— mürgisuse näitajate hinnangud, näiteks EC_x (ja selle usaldusvahemik), täheldatava toimeta kontsentratsioon ja/või vähim täheldatava toimega kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;

— tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise võimalik mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele".

15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

1. liide

MÕISTED

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse järgmisi mõisteid järgmises tähenduses:

spetsiaalselt koostatud sete (ehk taastatud, tehislik või sünteetiline sete) – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks;

kattev veekiht – vesi, mis pannakse katsenõus sette peale;

poorivesi – sette- või mullaosakeste vahelises ruumis olev vesi;

rikastatud vesi – katsevesi, millele on lisatud uuritavat ainet;

uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4

2. liide

***Chironomus riparius*'e kasvatamist käsitlevad soovitused**

1. *Chironomus*'e vastseid võib kasvatada kristallisatsiooninõus või suuremas mahutis. Mahuti põhi kaetakse ligikaudu 5–10 mm paksuse peene kvartsliiva kihiga. Diatomiit (näiteks Merck, Art 8117) on samuti tõendatult sobiv substraat (piisab õhemast kihist, isegi mõnest millimeetrist). Seejärel lisatakse sobivat vett mitme cm paksuse kihina. Vett tuleks vajaduse korral lisada aurumiskadude asendamiseks ja kuivamise vältimiseks. Vee võib vajaduse korral välja vahetada. Tuleks tagada kerge aereerimine. Vastsete kasvatamise nõusid tuleks hoida vastavas puuris, millega takistatakse väljaarenenud täiskasvanud isendite väljapääsu. Puur peaks olema piisavalt suur, et võimaldada väljaarenenud valmikute parvedesse kogunemist, vastasel juhul ei pruugi toimuda paljunemist (miinimumsuurus on ligikaudu 30 × 30 × 30 cm).

2. Puure tuleks hoida toatemperatuuril või püsiva keskkonnaga ruumis temperatuuril 20 ± 2 °C 16-tunnise valgustusperioodiga (intensiivsus ligikaudu 1 000 luksi) ja kaheksa tunni pimedusega. On teada, et vähem kui 60 %-line suhteline õhuniiskus võib paljunemist takistada.

Lahjendusvesi

3. Võib kasutada mis tahes looduslikku või sünteetilist vett. Enamasti kasutatakse kaevuvett, deklooritud kraanivett ja tehislikke kasvukeskkondi (näiteks Elendti kasvukeskkond M4 või M7, vt allpool). Vett tuleb enne kasutamist aereerida. Vajaduse korral võib kultuuri kasvuvett uuendada, eemaldades kasutatud vee kultuuri kasvunõudest ettevaatlikult valamise teel või sifooniga, kahjustamata vastsete kestasid.

Vastsete söötmine

4. *Chironomus*'e vastseid tuleks sööta helbelise kalasöödaga (TetraMin®, TetraPhyll® või muu samalaadne kaubanduslik kalasööda tootemark) koguses ligikaudu 250 mg nõu kohta päevas. Sööta võib anda kuiva jahvatatud pulbrina või suspensioonina vees: 1,0 g helbelist kalasööta lisatakse 20 ml lahjendusveele ja see segatakse homogeense segu saamiseni. Seda preparaati võib sööta koguses 5 ml nõu kohta päevas (preparaati tuleks enne kasutamist loksutada). Vanemad vastsed võivad vajada rohkem sööta.

5. Söötmist kohandatakse vee kvaliteediga. Kui kultuuri kasvukeskkond muutub häguseks, tuleks sööda hulka vähendada. Sööda lisamist tuleb hoolikalt jälgida. Liiga vähe sööta põhjustab vastsete rände veesamba suunas ning liiga palju sööta hoogustab mikroobide tegevust ja vähendab vee hapnikusisaldust. Mõlemad tingimused võivad vähendada kasvu kiirust.

6. Uute kultuuri kasvunõude valmisseadmisel võib lisada ka mõne rohevetika (näiteks *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) rakke.

Väljaarenenud valmikute söötmine

7. Mõned teadlased on soovitanud väljaarenenud valmikute söötmiseks kasutada küllastunud sahharoosilahuses niisutatud puuvillast lappi.

▼M4

Väljaarenemine

8. Ligikaudu 13–15 päeva möödumisel hakkavad temperatuuril 20 ± 2 °C vastsete kasvatamise nõudest väljuma valmikud. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.

Munamassid

9. Kui valmikud on paljundamispuuris, tuleks kõiki vastsete kasvatamise nõusid kontrollida kolm korda nädalas sinna želatiinjate munamasside lisandumise suhtes. Kui leitakse munamass, tuleks see hoolikalt kõrvaldada. See tuleks üle kanda väiksele tassile, mis sisaldab paljundusvee proovi. Munamasse kasutatakse uue kasvunõu kasutusele võtmiseks (näiteks 2–4 munamassi nõu kohta) või mürgisuse katsetes.

10. Esimese kasvujärgu vastsed peaksid kooruma 2–3 päeva pärast.

Uute kasvunõude ülesseadmine

11. Kui kultuurid on loodud, peaks iga nädal (või katsenõuetest olenevalt väiksema sagedusega) olema võimalik vastsete uute kasvunõude ülesseadmine, kõrvaldades vanemad nõud pärast täiskasvanud sääskede väljaarenemist. Seda süsteemi kasutades saadakse minimaalse vaevaga regulaarne valmikute varu.

Katselahuste M4 ja M7 valmistamine

12. Elendt (1990) on kirjeldanud kasvukeskkonda M4. Kasvukeskkond M7 valmistatakse samal viisil kui kasvukeskkond M4, v.a tabelis 1 nimetatud ainete puhul, mille kontsentratsioon kasvukeskkonnas M7 on kasvukeskkonnaga M4 võrreldes neli korda väiksem. Kasvukeskkonda M7 käsitlev artikkel on kirjutamisel (Elendt, isiklik teade). Katselahust ei tohiks koostada Elendti ja Biasi (1990) järgi, kuna põhilahuste valmistamiseks ei ole antud $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 ja K_2HPO_4 kontsentratsioon sobiv.

Kasvukeskkonna M7 valmistamine

13. Iga põhilahus (I) valmistatakse eraldi ja kombineeritud põhilahus (II) valmistatakse kõnealustest põhilahustest (I) (vt tabel 1). Kasvukeskkonna M7 valmistamiseks võetakse 50 ml kombineeritud põhilahust (II), lisatakse iga makrotoitaine põhilahuse kogused, mis on esitatud tabelis 2, ja täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse deioniseeritud veele kolme vitamiini, nagu on näidatud tabelis 3, ja lõplikule M7 kasvukeskkonnale lisatakse vahetult enne selle kasutamist 0,1 ml kombineeritud vitamiinide põhilahust. (Vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena). Kasvukeskkonda aereeritakse ja see stabiliseeritakse.

Tabel 1

Kasvukeskkondade M4 ja M7 mikroelementide põhilahused

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need 1 liitrini deioniseeritud veega		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need 1 liitrini deioniseeritud veega		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Need ained on M4 ja M7 puhul erinevad, nagu on eespool viidatud.
(2) Need lahused valmistatakse eraldi, valatakse seejärel kokku ja autoklaavitakse viivitamata.

Tabel 2

Kasvukeskkondade M4 ja M7 makrotoitainete põhilahused

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav makrotoitainete põhilahuste kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabel 3

Kasvukeskkondade M4 ja M7 vitamiinide põhilahus

Ühe vitamiinide põhilahuse valmistamiseks valatakse kokku kõik kolm vitamiinilahust.

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav vitamiinide põhilahuse kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinvesinikkloriid	750	0,1	0,075
Tsüanokobalamiin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiin	7,5	0,1	0,00075

KIRJANDUS

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

3. liide

SPETSIAALSELT KOOSTATUD SETTE VALMISTAMINE

Sette koostis

Spetsiaalselt koostatud sette koostis peaks olema järgmine:

Koostisosa	Kirjeldus	Sette kuivmassi protsent
Turvas	Turbasamblaturvas, mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0, nähtavad taimeosad puuduvad, peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) ja õhu käes kuivatatud	4–5
Kvartsliiv	Tera suurus: > 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 µm	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisisaldus ≥ 30 %	20
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 (±0,5)
Kaltsiumkarbonaat	$CaCO_3$, pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas	0,05–0,1
Vesi	Juhtivus ≤ 10 µS/cm	30–50

Valmistamine

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Valmistatakse vajaliku turbapulbrikoguse suspensioon deioniseeritud vees, kasutades tõhusat homogenisaatorit. Selle suspensiooni pH reguleeritakse $CaCO_3$ abil vahemikku 5,5 ± 0,5. Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks päeva temperatuuril 20 ± 2 °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent; pH mõõdetakse uuesti ja see peaks olema 6,0 ± 0,5. Seejärel segatakse turba suspensioon muude koostisosadega (liiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH mõõdetakse uuesti ja see reguleeritakse vajaduse korral $CaCO_3$ abil vahemikku 6,5–7,5. Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Enne, kui spetsiaalselt koostatud setet kasutatakse surusääsklastele mürgisuse katses, on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus.

Säilitamine

Tehisliku sette valmistamiseks kasutatavaid kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Spetsiaalselt koostatud (märga) setet ei tohiks enne selle katses kasutamist säilitada. Seda tuleks kasutada viivitamata pärast seitsmepäevast kohandamisperioodi, millega selle valmistamine lõpetatakse.

KIRJANDUS:

Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

4. liide

Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Karedus $CaCO_3$-na	< 400 mg/l (*)
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

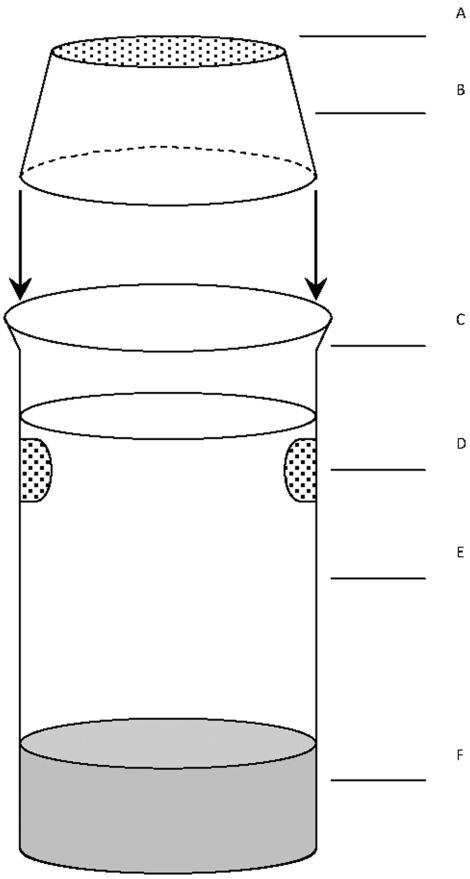
(*) Kui kahtlustatakse karedust tekitavate ioonide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks nimetatud olukorras kasutada Elendti kasvukeskkonda M4).

▼**M4**

5. liide

Suunised surusääsklaste vastsete valmikuteks väljaarenemise seireks

Katsenõudele paigaldatakse väljaarenenud valmikute püüdurid. Neid püüdureid vajatakse alates 20. päevast kuni katse lõpuni. Kasutatava püüduri näidis on esitatud allpool.



A – nailonvõrk

B – tagurpidi pööratud plastiktopsid

C – tilata kokkupuutenõu

D – sõelaga kaetud veevahetusavad

E – vesi

F – sete

▼M4

C.29. KIIRE BIOLAGUNDATAVUS – CO_2 SULETUD NÕUDES (VABARUUMI KATSE)

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 310 (2006). Käesolev katsemeetod on sõelumismeetod kemikaalide kiire biolagundatavuse hindamiseks ning see annab samalaadset teavet kui käesoleva lisa peatüki C.4 meetoditena C.4-A kuni C.4-F kirjeldatud kuus katsemeetodit. Seega võib käesoleva katsemeetodi alusel positiivse tulemuse saanud kemikaali pidada kiiresti biolagundatavaks ning seepärast ka keskkonnas kiiresti lagunevaks.

2. Halvasti lahustuvate ja tugevasti adsorbeeruvate kemikaalide uurimisel on esimene valik tavaliselt olnud süsinikdioksiidi (CO_2) meetod (1), mida kasutatakse juba ammu ja mis põhineb Sturmi algsel katsel (2), millega hinnatakse orgaaniliste kemikaalide biolagundatavust mikroobide toimel moodustunud süsinikdioksiidi mõõtmise teel. Seda on samuti kasutatud lahustuvate (kuid mitte lenduvate) kemikaalide puhul, kuna süsinikdioksiidi teket peavad paljud ainsaks kindlaks tõendiks mikroobide tegevuse kohta. Lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist võivad põhjustada füüsikalis-keemilised protsessid (adsorbeerumine, lendumine, sadestumine, hüdrolüüs) ning ka mikroobide tegevus ja mõned mittebioloogilised hapniku sidumise reaktsioonid; harva tekib CO_2 orgaanilistest kemikaalidest abiootilisel teel. Algses ja muudetud Sturmi katses (1, 2) kõrvaldatakse CO_2 vedelfaasist absorbeerimisnõudesse läbipuhumisega (s.o CO_2 kõrvaldamiseks töödeldud õhu barboteerimisega läbi vedeliku), aga Larsoni versioonis (3, 4) kantakse CO_2 reaktsiooninõust üle absorbeerijasse CO_2-vaba õhu suunamisega läbi vabaruumi ja katsenõu pideva raputamisega. Reaktsiooninõud raputatakse ainult Larsoni muudetud versiooni puhul; segamine on standardis ISO 9439 (5) ette nähtud ainult lahustumatute ainete puhul ja algses Ameerika Ühendriikide versioonis (6), mõlemas kasutatakse vabaruumi õhu asendamise asemel läbipuhumist. Teises Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseameti meetodis (7), mis põhineb Gledhilli meetodil (8), on raputatav reaktsiooninõu keskkonnast isoleeritud ja tekkiv CO_2 kogutakse otse gaasifaasist sisemisse leelispüüdurisse nagu klassikalistes Warburgi-Barcrofti respiromeetri kolbides.

3. Mitme kemikaali puhul on näidatud, et standardse muudetud Sturmi katse kasutamisel koguneb anorgaaniline süsinik kasvukeskkonda (9). Aniliini (kontsentratsioon 20 mg C/l) lagundamisel leiti anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon olevat lausa 8 mg/l. Seega ei väljenda leelispüüdurisse kogutud CO_2 lagunemise ajal mikrobioloogiliselt tekkinud CO_2 tegelikku kogust. Järelikult ei ole uuritava kemikaali kiiresti biolagunevaks klassifitseerimise tingimus, et > 60 % maksimaalsest teoreetiliselt tekkida võivast CO_2 kogusest tuleb koguda kümnepäevase ajavahemiku vältel (10 % biolagunemise saavutamisele vahetult järgnevad kümme päeva), täidetud mõne kemikaali puhul, mis lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise alusel klassifitseeritaks kiiresti biolagunevaks.

4. Kui lagunemise protsent on eeldatavast väiksem, võib anorgaaniline süsinik olla kogunenud katselahusesse. Sel juhul võib lagunemist hinnata muude kiire biolagundatavuse katsete abil.

▼M4

5. Muud Sturmi meetodi puudused (keerukas, aeganõudev, suurem katsevea tekke tõenäosus, mitte kasutatav lenduva kemikaali puhul) sundisid varem otsima gaasi läbijuhtimise asemele Gledhilli meetodile alternatiivset suletud nõu meetodit (10, 11). Boatman *et al.* (12) vaatasid varasemad meetodid läbi ja võtsid kasutusele suletud vabaruumi süsteemi, milles CO_2 lasti inkubatsiooni lõpus kasvukeskkonna hapestamise teel vabaruumi. CO_2 mõõdeti gaaskromatograafia / anorgaanilise süsiniku analüüsi abil vabaruumist automaatselt võetud proovides, aga vedelfaasis lahustunud anorgaanilist süsinikku ei võetud arvesse. Kasutatud nõud olid väga väiksed (20 ml) ja sisaldasid ainult 10 ml kasvukeskkonda, mis tekitas raskusi; näiteks oli raske lisada lahustumatu uuritava kemikaali vajalikku väga väikest kogust ja/või inokuleeritud kasvukeskkonnas ei pruukinud olla piisavalt või üldse mikroorganisme, kes suudavad uuritavat kemikaali lagundada.

6. Need probleemid on ületatud Struijsi ja Stoltenkampi (13) ning Birchi ja Fletcheri (14) sõltumatute uuringutega. Viimati nimetatud autoreid inspireerisid nende kogemused seadmega, mida kasutati anaeroobse biolagunemise katses (15). Esimesena nimetatud meetodi (13) kohaselt mõõdeti CO_2 vabaruumis pärast hapestamist ja tasakaalustamist ning teise meetodi (14) puhul mõõdeti lahustunud anorgaaniline süsinik nii gaasilises kui ka vedelfaasis ilma töötlemiseta; üle 90 % tekkinud anorgaanilisest süsinikust leiti vedelfaasis. Mõlemal meetodil on eeliseid Sturmi katse ees, kuna nende katsesüsteem on kompaktsem ja lihtsamini kasutatav, saab uurida ka lenduvaid kemikaale ning tekkinud CO_2 mõõtmise viivituste võimalus on välditud.

7. Kaks nimetatud lähenemisviisi on ühendatud ISO vabaruumi CO_2 standardmeetodis (16), millega on tehtud laboritevaheline võrdluskatse (17), nimetatud standardmeetod on käesoleva katsemeetodi alus. Samal viisil on Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseameti meetodis (18) kasutatud kahte lähenemisviisi. Soovitatud on CO_2 mõõtmise kahte meetodit, nimelt vabaruumi CO_2 pärast hapestamist (13) ja anorgaaniline süsinik vedelfaasis pärast leelise liia lisamist. Viimati nimetatud meetodi võttis kasutusele Peterson naftaettevõtjate Euroopa assotsiatsiooni keskkonna ning tööohutuse ja töötervishoiu toetamiseks (CONCAWE) tehtud kõnealuse vabaruumi meetodi (mida on muudetud iseenesliku biolagunemise mõõtmiseks) laboritevahelise võrdluskatse ajal (19). Käesoleva lisa peatükis C.4 esitatud kiire biolagundatavuse meetodite läbivaatamisega seoses 1992. aastal tehtud muudatused (20) on kaasatud käesolevasse katsemeetodisse ja seega on tingimused (kasvukeskkond, kestus jne) muudel puhkudel samad kui läbivaadatud Sturmi katses (20). Birch ja Fletcher (14) on näidanud, et käesoleva vabaruumi katsega väga sarnased tulemused saadi läbivaadatud katsemeetodite OECD laboritevahelises võrdluskatses samade kemikaalidega (21).

KATSE PÕHIMÕTE

8. Uuritavat kemikaali, tavaliselt 20 mg C/l, kui ainsat süsiniku ja energia allikat inkubeeritakse puhvermineraalsoolade kasvukeskkonnas, millesse on külvatud mikroorganismide segapopulatsioon. Katse tehakse suletud pudelites, milles on vaba ruum õhu jaoks; see tagab hapnikuvaru aeroobseks biolagunemiseks. Uuritava kemikaali täielikust aeroobsest biolagunemisest põhjustatud CO_2 teke määratakse sel viisil, et mõõdetakse katsepudelites tekkinud anorgaaniline süsinik ja lahutatakse sellest inokuleerimata kasvukeskkonda sisaldavates kontrollkatse nõudes tekkinud anorgaaniline süsinik. Biolagunemise ulatus väljendatakse protsendina anorgaanilise süsiniku tekkimise maksimaalsest teoreetilisest kogusest, mis arvutatakse algselt lisatud uuritava kemikaali (orgaanilise süsiniku) koguse alusel.

9. Võimalik on mõõta ka lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määra ja/või uuritava kemikaali esmase biolagunemise ulatust (20).

▼M4

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

10. Lagunemise protsendi arvutamiseks peab uuritava kemikaali orgaanilise süsiniku sisaldus (massiprotsent) olema teada kas selle keemilise struktuuri põhjal või mõõtmise teel. Lenduva uuritava kemikaali puhul aitab mõõdetud või arvutatud Henry seaduse konstant leida sobiva vabaruumi ja vedeliku koguse suhte. Sobiva katsekontsentratsiooni valimiseks ning halba biolagundatavust näitavate tulemuste tõlgendamiseks on kasulik omada teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta mikroorganismidele: kui ei ole teada, kas uuritav kemikaal inhibeerib mikroobide tegevust, soovitatakse kaasata inhibitsiooni kontrollrühm (vt punkt 24).

MEETODI KASUTUSALA

11. Katset kasutatakse nii vees lahustuvate kui ka mittelahustuvate uuritavate kemikaalide puhul, kuid tuleks tagada uuritava kemikaali hea dispersioon. Soovitatud vabaruumi ja vedeliku koguse suhte 1 : 2 kasutamisel on võimalik uurida lenduvaid kemikaale Henry seaduse konstandiga kuni 50 $Pa \cdot m^3 \cdot mol^{-1}$, kuna vabaruumis oleva uuritava kemikaali osakaal ei ületa sel juhul veel 1 % (13). Lenduvama kemikaali uurimisel võib kasutada väiksemat vabaruumi, aga piiravaks teguriks võib olla selle biosaadavus, eriti kui kemikaal on vees halvasti lahustuv. Kasutaja peab siiski tagama, et vabaruumi ja vedeliku koguse suhe ning uuritava kemikaali kontsentratsioon on sellised, et täieliku aeroobse biolagunemise toimumiseks oleks piisavalt hapnikku (vältige näiteks substraadi suure kontsentratsiooni ja väikse vabaruumi mahu kasutamist). Suuniseid selle kohta võib leida väljaannetes (13, 23).

VÕRDLUSKEMIKAALID

12. Katse korrektse läbiviimise kontrollimiseks tuleks paralleelselt katsetada teadaoleva biolagunevusega võrdluskemikaali. Vees lahustuva uuritava kemikaali katsetamisel võib selleks kasutada aniliini, naatriumbensoaati või etüleenglükooli ja halvasti lahustuva uuritava kemikaali katsetamisel 1-oktanooli (13). Nimetatud kemikaalide biolagunemine peab 14 päeva jooksul jõudma > 60 %-ni maksimaalsest teoreetiliselt võimalikust anorgaanilise süsiniku kogusest.

REPRODUTSEERITAVUS

13. Meetodi ISO standardi kohases laboritevahelises võrdluskatses (17) saadi soovitatud tingimuste kasutamisel 20 mg C uuritava kemikaaliga liitri kohta järgmised tulemused.

Uuritav kemikaal	Keskmine biolagundamise protsent (28 päeva)	Variatsioonikordaja (%)	Laborite arv
Aniliin	90	16	17
1-oktanool	85	12	14

Katsesisene variatsioon (korratavus) oli aniliini puhul hea ja variatsioonikordajad ei olnud peaaegu üheski katses suuremad kui 5 %. Kahel juhul, kui korratavus oli halvem, oli suurem variatsioon tõenäoliselt põhjustatud suuremahulisest anorgaanilise süsiniku tekkimisest kontrollkatsetes. Korratavus oli 1-oktanooli puhul halvem, kuid jäi 79 % katsete puhul ikkagi alla 10 %. See katsesisene suurem variatsioon võis olla põhjustatud doseerimisvigadest, kuna suletud katsepudelitesse tuli lisada väike kogus (3–4 µl) 1-oktanooli. Uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooni kasutamisel on tulemuseks suuremad variatsioonikordajad, eelkõige kontsentratsioonil, mis on väiksem kui 10 mg C/l. Seda on võimalik osaliselt vältida, vähendades anorgaanilise süsiniku üldkontsentratsiooni inokulumis.

▼**M4**

14. ELi laboritevahelises võrdluskatses, milles lisati viit pindaktiivset ainet koguses 10 mg C/l (24), saadi järgmised tulemused.

Uuritav kemikaal	Keskmine biolagundamise protsent (28 päeva)	Variatsioonikordaja (%)	Laborite arv
Tetrapropüleenbenseensulfonaat	17	45	10
Diisooktüül-sulfosuktsinaat (anioonne)	72	22	9
Heksadetsüültrimetüülammooniumkloriid (katioonne) (*)	75	13	10
Isononüülfenool(etoksülaat)$_9$ (mitteioonne)	41	32	10
Kookosamiid-propüüldimetüülhüdroksü-sulfobetaiin (amfoteerne)	60	23	11

(*) Mürgisuse neutraliseerimiseks lisati SiO_2.

Tulemused näitavad, et enamasti oli variatsioon suurem halvemini lagunenud pindaktiivsete ainete puhul. Katsesisene variatsioon oli väiksem kui 15 % enam kui 90 % juhtudest ja suurim variatsioon jäi vahemikku 30–40 %.

MÄRKUS. Enamik pindaktiivseid aineid ei ole individuaalsed ained, vaid kujutavad endast selliste isomeeride, homoloogide jne segu, mis lagunevad pärast erinevaid iseloomulikke ooteperioode ja erineva kineetilise kiirusega. Seetõttu on kõverad „hägused”, venivad, mistõttu ei pruugita kümnepäevase ajavahemiku jooksul jõuda nõutava 60 % väärtuseni, kuigi iga aine eraldi katsetatuna jõuaks kümne päevaga > 60 % väärtuseni. Seda võib täheldada ka muude keerukate segude puhul.

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

15. Tavalised laboriseadmed ja

a) klaasist seerumipudelid, mis on suletud butüülkummist korgi ja pealevaltsitava alumiiniumkapsliga. Soovitatav suurus on nn 125 ml pudel, mille kogumaht on ligikaudu 160 ml (sel juhul peaks iga pudeli maht olema teadaolevalt 160 ± 1 ml). Kui tulemused vastavad punktides 66 ja 67 kirjeldatud tingimustele, võib kasutada väiksemaid nõusid;

b) süsiniku analüsaator või muu mõõteseade (näiteks gaaskromatograaf) anorgaanilise süsiniku mõõtmiseks;

▼M4

c) suure täpsusega süstlad gaasi- ja vedelikeproovide võtmiseks;

d) orbitaalloksuti reguleeritud temperatuuriga keskkonnas;

e) varustatus CO_2-vaba õhuga; selle tagamiseks juhitakse õhk läbi kaltsiumhüdroksiidi ja naatrium-/kaaliumhüdroksiidi segu graanulite või kasutatakse (soovi korral) gaaside segu koostisega 80 % N_2 ja 20 % O_2 (vt punkt 28);

f) membraanfiltrimisseade poori suurusega 0,20–0,45 μm (soovi korral);

g) orgaanilise süsiniku analüsaator (soovi korral).

Reagendid

16. Kogu katse vältel tuleb kasutada analüütiliselt puhtaid reagente.

Vesi

17. Tuleks kasutada destilleeritud või deioniseeritud vett, mille orgaanilise süsiniku kogusisaldus on ≤ 1 mg/l. See moodustab ≤ 5 % algsest orgaanilise süsiniku sisaldusest, mis lisatakse soovitatud doosi uuritava kemikaaliga.

Mineraalsooli sisaldava kasvukeskkonna põhilahused

18. Põhilahused ja mineraalsooli sisaldav kasvukeskkond on samalaadsed kui standardis ISO 14593 (16) ja meetodi C.4 kiire biolagundatavuse katsetes (20). Suurema ammooniumkloriidi kontsentratsiooni kasutamine (2,0 g/l 0,5 g/l asemel) peaks olema vajalik ainult väga erandlikel juhtudel, näiteks siis, kui uuritava kemikaali kontsentratsioon on > 40 mg C/l. Põhilahuseid tuleks säilitada jahutatult ja need tuleks ära visata kuue kuu möödumisel või varem, kui esineb sadestumise või mikroobide kasvu märke. Valmistatakse järgmised põhilahused:

a) kaaliumdivesinikfosfaat (KH_2PO_4) 8,50 g;

dikaaliumvesinikfosfaat (K_2HPO_4) 21,75 g;

dinaatriumvesinikfosfaatdihüdraat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 33,40 g;

ammooniumkloriid (NH_4Cl) 0,50 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini. Lahuse pH peaks olema 7,4 (±0,2). Kui see ei ole nii, tuleks valmistada uus lahus;

b) kaltsiumkloriiddihüdraat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 36,40 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini;

c) magneesiumsulfaatheptahüdraat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 22,50 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini;

d) raud(III)kloriidheksahüdraat ($FeCl_3 \cdot 6H_20$) 0,25 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini ning lisage üks tilk kontsentreeritud HCl.

Mineraalse kasvukeskkonna valmistamine

19. Segage 10 ml lahust a ligikaudu 800 ml veega (punkt 17), seejärel lisage 1 ml lahuseid b, c ja d ning lisage vett 1 liitrini (punkt 17).

Muud reagendid

20. Kontsentreeritud ortofosforhape (H_3PO_4) (> 85 massiprotsenti).

▼M4

Naatriumhüdroksiidi lahus 7M

21. Lahustage 280 g naatriumhüdroksiidi (NaOH) 1 liitris vees (punkt 17). Määrake saadud lahuses lahustunud anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon ja võtke seda näitajat katsetulemuse arvutamisel arvesse (vt punktid 55 ja 61), pidades eelkõige silmas punktis 66 esitatud kehtivuse kriteeriumi (b). Kui lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon on liiga suur, siis valmistage uus lahus.

Uuritav kemikaal

22. Valmistage vees (punkt 17) või kasvukeskkonnas (punkt 19) vees piisavalt lahustuva uuritava kemikaali põhilahus, mille kontsentratsioon on eelistatavalt 100 korda suurem kui katses kasutatav lõplik kontsentratsioon; vajalik võib olla põhilahuse pH reguleerimine. Põhilahust tuleks lisada mineraalsele kasvukeskkonnale, et saada lõplik orgaanilise süsiniku kontsentratsioon vahemikus 2–40 mg C/l, eelistatavalt 20 mg C/l. Kui kasutatakse sellest väiksemat kontsentratsiooni, võib väheneda katse täpsus. Täpse mõõtesüstla abil võib nõudesse lisada lahustuvat või lahustumatut vedelat kemikaali. Halvasti lahustuva või lahustumatu uuritava kemikaali puhul võib vaja minna erimeetodit (25). Valikud on järgmised:

a) teadaoleva kaalutud koguse otse lisamine;

b) enne lisamist ultraheliga dispergeerimine;

c) dispergeerimine emulgaatoriga; sel juhul tuleb enne lisamist kindlaks teha, kas emulgaator mõjutab (inhibeerib või stimuleerib) mikroobide tegevust;

d) vedela uuritava kemikaali või sobiva lenduva lahusti abil saadud lahuse adsorbeerimine inertsele kandjale või tugimaterjalile (näiteks klaaskiudfilter), millele järgneb lahusti (kui seda kasutati) aurustamine ja teadaoleva koguse otse lisamine;

e) teadaolev kogus uuritava kemikaali lahust kergesti lenduvas lahustis viiakse tühja katsenõusse ja aurustatakse seejärel lahusti.

Alapunktide c, d ja e puhul kasutatavaid aineid või lahusteid tuleb katsetada, et teha kindlaks nende võimalik stimuleeriv või inhibeeriv mõju mikroobide tegevusele (vt punkti 42 alapunkt b).

Võrdluskemikaal

23. Valmistage vees (punkt 17) (lahustuva) võrdluskemikaali põhilahus, mille kontsentratsioon on eelistatavalt 100 korda suurem kui katses kasutatav lõplik kontsentratsioon (20 mg C/l).

Inhibeerimise kontroll

24. Uuritavad kemikaalid sageli ei lagune kiire biolagunemise hindamiseks kasutatavates tingimustes. Üks võimalikke põhjusi on see, et uuritav kemikaal inhibeerib katses kasutataval kontsentratsioonil inokulumi. Katseprojekti võib lisada inhibeerimise kontrollkatse, et teha (tagantjärele) kindlaks inhibeerimine kui võimalik põhjus või mõjutav tegur. Alternatiivselt võib inhibeerimise kontrollkatsega kõnealuse mõju välistada ja näidata, et lagunemise puudumine või vähene lagunemine on põhjustatud üksnes vastupidavusest mikroobide rünnakule katse tingimustes. Et saada teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta (aeroobsetele) mikroorganismidele, valmistage katse kasvukeskkonnas lahus, mis sisaldab uuritavat kemikaali ja võrdluskemikaali (punkt 19) vastavalt igal lisatud kontsentratsioonil (vt punktid 22 ja 23).

▼M4

Inokulum

25. Inokulumi saamiseks võib kasutada mitmeid allikaid: aktiivmuda; reovee väljavool (kloorimata); pinnavesi ja muld või nimetatute segu (20). Võrdluskemikaali abil tuleks kontrollida sellise inokulumi biolagundavat toimet. Olenemata lähtematerjalist ei tohiks kasutada uuritava kemikaaliga varem kokku puutunud mikroorganisme, kui meetodit kasutatakse kiire biolagundatavuse katsena.

Hoiatus. Aktiivmuda, reovesi ja reovee väljavool sisaldavad haigusetekitajaid ja neid tuleb käsitleda ettevaatusega.

26. Kogemuste põhjal on optimaalne inokulumi kogus selline, mis

— on piisav asjakohase biolagunemise tagamiseks;

— lagundab võrdluskemikaali kindlaksmääratud protsendi võrra (vt punkt 66);

— tagab lõppsegus $10^2 – 10^5$ kolooniaid moodustava ühiku olemasolu milliliitri kohta;

— tagab aktiivmuda kasutamisel lõppsegus tavaliselt hõljuvaine kontsentratsiooni 4 mg/l, võib kasutada kontsentratsioone kuni 30 mg/l, kuid need võivad märkimisväärselt suurendada CO_2 tekkimist kontrollkatsetes (26);

— ei sisalda rohkem kui 10 % uuritava kemikaaliga lisatavast orgaanilise süsiniku lähtekontsentratsioonist;

— võimaldab lisada tavaliselt 1–10 ml inokulumi 1 liitri katselahuse kohta.

Aktiivmuda

27. Aktiivmuda kogutakse värskelt reoveepuhasti või peamiselt olmereovett töötleva laborimõõdus seadme aeratsiooninõust. Vajaduse korral tuleks suured osakesed sõelumisega kõrvaldada (sõelaava näiteks 1 mm^2) ja muda tuleks hoida kuni kasutamiseni aeroobsena.

28. Alternatiivselt võib aktiivmuda pärast suurte osakeste kõrvaldamist lasta settida või tsentrifuugida (näiteks 1 100 × g 10 minuti vältel). Supernatant valatakse ära. Muda võib pesta mineraalse lahusega. Suspendeerige kontsentreeritud hõljuvaine mineraalses toitekeskkonnas, et saada kontsentratsioon 3–5 g tahkeid osakesi liitri kohta. Seejärel aereerige, kuni on vaja.

29. Muda tuleks võtta tavapärasest töökorras puhastist. Suure koormusega puhastist pärinevat või inhibiitoreid sisaldavat muda tuleks pesta. Pärast põhjalikku segamist resuspendeeritud muda setitatakse või tsentrifuugitakse, kõrvaldatakse supernatant ja suspendeeritakse muda uuesti järgmises koguses mineraalses toitekeskkonnas. Seda korratakse, kuni muda peaks olema vaba liigsest substraadist või inhibiitorist.

30. Täielikult resuspendeeritud või töötlemata mudast võetakse vahetult enne kasutamist proov hõljuvaine kuivkaalu määramiseks.

31. Veel üks võimalus on aktiivmuda homogeniseerida (3–5 g hõljuvainet / l). Muda töödeldakse Waringi segistis keskmisel kiirusel 2 min. Segatud muda setitatakse 30 minutit või vajaduse korral kauem ja dekanteeritakse vedelik, mida kasutatakse inokulumina kontsentratsioonil u 10 mg/l mineraalse kasvukeskkonna kohta.

▼M4

32. CO_2 teket kontrollkatsetes on võimalik vähendada veel sellega, et muda aereeritakse järgmise päevani õhuga, mis ei sisalda CO_2. Sellises katses kasutatakse inokulumi kontsentratsiooni 4 mg aktiivmuda tahkeid osakesi 1 liitri kohta (13).

Reovee teisene väljavool

33. Inokulumi võib saada ka valdavalt olmereovett töötleva puhasti või laborimõõdus seadme sekundaarsest väljavoolust. Säilitage proovi aeroobsetes tingimustes ja kasutage seda võtmise päeval või laske sellel vajaduse korral kohaneda. Väljavool tuleks filtrida läbi jämefiltri, et eemaldada suured osakesed, ja seejärel mõõta pH.

34. Väljavoolu anorgaanilise süsiniku sisalduse vähendamiseks puhutakse filtraadist läbi CO_2-vaba õhku (punkti 15 alapunkt e) ühe tunni vältel, hoides ortofosforhappe abil pH väärtust 6,5 (punkt 20). Algne pH taastatakse naatriumhüdroksiidiga (punkt 21) ja pärast ligikaudu üks tund kestnud settimist võetakse inokulatsiooniks vajalik kogus supernatanti. Sellise barboteerimisega vähendatakse inokulumis anorgaanilise süsiniku sisaldust. Kui inokulumina kasutati näiteks filtritud barboteeritud väljavoolu maksimaalset soovituslikku kogust (100 ml/l), jäi kontrollnõudes olev anorgaanilise süsiniku kogus vahemikku 0,4 kuni 1,3 mg/l (14), mis moodustas 2–6,5 % uuritava kemikaaliga lisatud süsinikusisaldusest 20 mg C/l juures ja 4–13 % 10 mg C/l juures.

Pinnavesi

35. Proov võetakse asjakohasest pinnaveest. Seda tuleks hoida aeroobsetes tingimustes ja kasutada võtmise päeval. Proov peaks vajaduse korral olema kontsentreeritud filtrimise või tsentrifuugimisega. Igas katsenõus kasutatud inokulumi maht peaks vastama punktis 26 esitatud kriteeriumidele.

Muld

36. Maapinnast kuni 20 cm sügavuselt võetakse asjakohane mullaproov. Kivid, taimejäänused ja selgrootud tuleks mullaproovist eemaldada enne selle sõelumist läbi 2 mm avaga sõela (kui proov on kohe sõelumiseks liiga märg, kuivatage seda sõelumise võimaldamiseks osaliselt õhu käes). Proovi tuleks hoida aeroobsetes tingimustes ja kasutada võtmise päeval (kui proovi transporditakse lõdvalt kinniseotud mustas polüetüleenkotis, siis võib seda kotis säilitada 2–4 °C juures kuni ühe kuu vältel).

Inokulumi kohanemine

37. Inokulumil võib lasta kohaneda katsetingimustega, kuid mitte uuritava kemikaaliga. Kohanemine võib vähendada CO_2 teket kontrollkatsetes. Kohanemine hõlmab aktiivmuda katsetemperatuuril aereerimist niiske CO_2-vaba õhuga 5–7 päeva jooksul pärast muda lahjendamist katse kasvukeskkonnas kontsentratsioonini 30 mg/l.

KATSE KÄIK

Pudelite arv

38. Katse jaoks vajalike pudelite arv (punkti 15 alapunkt a) oleneb analüüside sagedusest ja katse kestusest.

39. On soovitatav analüüsida piisavate ajavahemike järel kolme pudelit, et oleks võimalik määrata kindlaks kümnepäevane ajavahemik. Katse lõpus analüüsitakse vähemalt viit katsepudelit (punkti 15 alapunkt a) komplektidest a, b ja c (vt punkt 42), et saaks arvutada biolagunemise keskmise protsendilise näitaja 95 % usaldusvahemikku.

▼M4

Inokuleeritud kasvukeskkond

40. Inokulumi kasutatakse kontsentratsioonil 4 mg aktiivmuda tahkeid kuivi osakesi ühe liitri kohta. Vahetult enne kasutamist valmistage piisavalt inokuleeritud kasvukeskkond, lisades näiteks 2 ml töödeldud aktiivmuda (punktid 27–32) kontsentratsiooniga 2 000 mg/l 1 liitrile mineraalsooli sisaldavale kasvukeskkonnale (punkt 19). Reovee sekundaarse väljavoolu kasutamise korral lisage kuni 100 ml väljavoolu (punkt 33) 900 ml mineraalsooli sisaldavale kasvukeskkonnale (punkt 19) ja lahjendage kasvukeskkonnaga 1 liitrini.

Pudelite ettevalmistamine

41. Inokuleeritud kasvukeskkonna alikvoodid sisestatakse paralleelproovide pudelitesse, et saada vabaruumi ja vedeliku suhe 1 : 2 (näiteks 160 ml mahuga pudelitesse lisage 107 ml). Võib kasutada ka muud suhtarvu, kuid seejuures tuleb arvesse võtta punktis 11 esitatud hoiatust. Ükskõik kumba tüüpi inokulumi kasutamise puhul tuleb jälgida, et inokuleeritud kasvukeskkond oleks piisavalt segatud, et selle saaks ühtlaselt jaotada katsepudelitesse.

42. Valmistatakse ette järgmise sisuga pudelite komplektid (punkti 15 alapunkt a):

a) uuritavat kemikaali sisaldavad katsenõud (tähis F_T);

b) ainult katse kasvukeskkonda ja inokulumi sisaldavad kontrollnõud (tähis F_B); neisse tuleb lisada ka kõik kemikaalid, lahustid, ained või klaaskiudfiltrid, mida kasutatakse uuritava kemikaali lisamiseks katsenõudesse;

c) nõud võrdluskemikaaliga (tähis F_C) katse õige läbiviimise kontrollimiseks;

d) vajaduse korral uuritava kemikaali võimaliku inhibeeriva mõju kontrollimise nõud (tähis F_I), mis sisaldavad nii uuritavat kemikaali kui ka võrdluskemikaali samal kontsentratsioonil kui vastavalt pudelid F_T ja F_C (punkt 24);

e) nõud (tähis F_S) nagu punktis a võimaliku abiootilise lagunemise kontrollimiseks, millesse lisatakse 50 mg/l $HgCl_2$ või mis steriliseeritakse muul viisil (näiteks autoklaavimine).

43. Vees lahustuvad uuritavad kemikaalid ja võrdluskemikaalid lisatakse põhilahustena vees (punktid 22, 23 ja 24), et saada kontsentratsioon 10–20 mg C/l.

44. Lahustumatu uuritav kemikaal ja lahustumatu võrdluskemikaal lisatakse pudelitesse sobival viisil (vt punkti 22 alapunktid a–e), olenevalt uuritava kemikaali laadist ja lisamise meetodist kas enne või pärast inokuleeritud kasvukeskkonna lisamist. Kui kasutatakse punkti 22 alapunktides a–e nimetatud meetodit, tuleks kontrollpudeleid F_B (punkti 42 alapunkt b) töödelda samal viisil, kuid ilma uuritavat kemikaali või võrdluskemikaali lisamata.

45. Lenduv uuritav kemikaal tuleks mikrosüstla abil sisestada suletud pudelisse (punkt 47). Doos arvutatakse sisestatava koguse ja uuritava kemikaali tiheduse alusel.

46. Vajaduse korral tuleks nõudesse lisada vett, et kõigis nõudes oleks ühesugune vedelikukogus. Tuleb tagada, et vabaruumi ja vedeliku suhe (enamasti 1 : 2) ning uuritava kemikaali kontsentratsioon on sellised, et vabaruumis on piisavalt hapnikku täieliku biolagunemise võimaldamiseks.

▼M4

47. Kõik pudelid suletakse seejärel näiteks butüülkummist vahekorgi ja alumiiniumkapsliga. Lenduv uuritav kemikaal tuleks lisada selles etapis (punkt 45). Kui katselahuses jälgitakse lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni vähenemist ning kui anorgaanilise süsiniku algkontsentratsiooni (steriilne kontrollkatse, punkti 42 alapunkt e) või muid näitajaid määratakse aja nullpunktis, siis eemaldatakse asjaomane proov katsenõust. Katsenõu ja selle sisu tuleb seejärel kõrvaldada.

48. Suletud pudelid asetatakse pöördloksutile (punkti 15 alapunkt d), mille loksutuskiirus on piisav pudeli sisu hästi segatuna ja suspensioonis hoidmiseks (näiteks 150 kuni 200 pööret minutis), ja inkubeeritakse pimedas temperatuuril 20 ± 1 °C.

Proovide võtmine

49. Proovide võtmise kava sõltub ooteperioodist ja uuritava kemikaali biolagunemise kineetilisest kiirusest. Pudelid analüüsitakse proovivõtu päeval; proove võetakse vähemalt iga nädal või sagedamini (näiteks kaks korda nädalas), kui on vaja koostada täielik lagunemiskõver. Loksutist võetakse nõutav arv F_T, F_B ja F_C paralleelproovide pudeleid ning, kui neid kasutatakse, siis ka F_I ja F_S pudeleid (vt punkt 42). Katse kestus on tavaliselt 28 päeva. Kui biolagunemise kõver näitab, et enne 28 päeva möödumist on jõutud platooni, siis võib katse lõpetada enne 28. päeva. Võtke proovid viiest pudelist, mis on hoitud 28. päeva analüüsi jaoks, ja kasutage tulemusi, et arvutada biolagunemise protsendi usalduspiirid või variatsioonikordaja. Inhibeerimise ja abiootilise lagunemise kontrollkatsete pudeleid ei ole vaja võtta proovideks sama sagedasti kui teisi pudeleid; piisab proovi võtmisest 1. ja 28. päeval.

Anorgaanilise süsiniku analüüs

50. CO_2 tekkimine pudelites inkubeerimise ajal tehakse kindlaks anorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni suurenemise mõõtmisega. Katse jooksul tekkinud anorgaanilise süsiniku koguse mõõtmiseks on kaks soovitatud meetodit, mida on kirjeldatud allpool. Kuna meetodid võivad anda veidi erineva tulemuse, tuleks katse vältel neist kasutada ainult ühte.

51. Meetodit a soovitatakse juhul, kui kasvukeskkond võib tõenäoliselt sisaldada näiteks klaasfilterpaberi ja/või lahustumatu uuritava kemikaali jääke. Kui süsiniku analüsaatorit ei ole, siis võib selle analüüsi teha gaaskromatograafiga. Vabaruumi gaasi analüüsimise käigus on tähtis, et pudelid oleksid katsetemperatuuril või sellele lähedal. Meetod b võib olla lihtsam laborile, kes kasutab anorgaanilise süsiniku mõõtmiseks süsiniku analüsaatorit. On tähtis, et CO_2 karbonaadiks muundamiseks kasutatav naatriumhüdroksiidi lahus (punkt 21) oleks kas värskelt valmistatud või selle anorgaanilise süsiniku sisaldus oleks teada, et seda saaks katsetulemuste arvutamisel arvesse võtta (vt punkti 66 alapunkt b.)

Meetod a: hapestamine pH-ni < 3

52. Enne iga analüüside partiid kaliibritakse anorgaanilise süsiniku analüsaator asjakohase anorgaanilise süsiniku standardi abil (näiteks 1 massiprotsent CO_2 N_2-s). Läbi iga proovivõtuks kasutatava pudeli vahekorgi süstitakse kontsentreeritud ortofosforhapet (punkt 20), et viia kasvukeskkonna pH väärtusele < 3 (näiteks 107 ml katse kasvukeskkonnale lisatakse 1 ml). Pudelid pannakse tagasi loksutile. Pärast ühetunnilist loksutamist katsetemperatuuril võetakse pudelid loksutilt, iga pudeli vabaruumist võetakse gaasi alikvoot (näiteks 1 ml) ja süstitakse anorgaanilise süsiniku analüsaatorisse. Anorgaanilise süsiniku mõõdetud kontsentratsioon väljendatakse ühikutes mg C/l.

▼M4

53. Selle meetodi põhimõte seisneb asjaolus, et pärast hapestamist tasemele pH < 3 ja tasakaalustamist 20 °C juures on katsepudelites CO_2 vedela ja gaasifaasi vahel jaotumise tasakaalukonstant 1,0, kui seda mõõdetakse kontsentratsioonina (13). Seda tuleks katsesüsteemi puhul vähemalt üks kord järgmiselt tõendada.

Valmistage ette pudelid, mis sisaldavad 5 ja 10 mg/l anorgaanilist süsinikku, kasutades veevaba naatriumkarbonaadi (Na_2CO_3) lahust CO_2-vabas vees, mis on valmistatud kontsentreeritud ortofosforhappe abil (punkt 20) vee pH viimisega väärtuseni 6,5, lahuse barboteerimisega järgmise päevani CO_2-vaba õhuga ja pH viimisega neutraalseks leelise abil. Kontrollige, et vabaruumi mahu ja vedelikukoguse suhe oleks sama kui katsete puhul (näiteks 1 : 2). Hapestage ja tasakaalustage punktis 52 kirjeldatud viisil ning mõõtke anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon nii vabaruumis kui ka vedelfaasis. Kontrollige, et need kaks kontsentratsiooni langeksid katsevea piires kokku. Kui need kokku ei lange, peaks katse tegija meetodid üle vaatama. Seda anorgaanilise süsiniku vedela ja gaasifaasi vahel jaotumise kontrolli ei ole vaja teha iga katse puhul; seda võib eeldatavasti teha kalibreerimise ajal.

54. Kui mõõdetakse lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist (ainult vees lahustuvad uuritavad kemikaalid), tuleks proovid võtta eraldi (hapestamata) pudelite vedelfaasist, filtrida membraanfiltriga ja süstida lahustunud orgaanilise süsiniku analüsaatorisse. Neid pudeleid võib vajaduse korral kasutada muudeks analüüsideks, et mõõta esmast biolagunemist.

Meetod b: CO_2 muundamine karbonaadiks

55. Enne iga analüüside partiid kaliibritakse anorgaanilise süsiniku analüsaator asjakohase standardi abil, näiteks naatriumvesinikkarbonaadi ($NaHCO_3$) lahusega CO_2-vabas vees (vt punkt 53) anorgaanilise süsiniku vahemikus 0–20 mg/l. Läbi iga proovivõtuks kasutatava pudeli vahekorgi süstitakse naatriumhüdroksiidi lahust (7M, punkt 21) (näiteks 107 ml kasvukeskkonna kohta lisatakse 1 ml) ja pudeleid loksutatakse tund aega katsetemperatuuril. Kõigisse konkreetsel päeval kasutatavatesse pudelitesse süstitakse sama NaOH lahust; katse eri proovivõtukordadel aga ei ole vaja kasutada sama lahust. Kui kõigil proovivõtukordadel on vaja mõõta anorgaanilise süsiniku absoluutsed väärtused kontrollkatsetes, tuleb iga kasutamise ajal määrata NaOH lahuses anorgaaniline süsinik. Pudelid võetakse loksutilt ja neil lastakse settida. Iga nõu vedelfaasist võetakse süstlaga vajalik kogus (näiteks 50 – 1 000 µl). Proov süstitakse anorgaanilise süsiniku analüsaatorisse ja registreeritakse anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon. Kasutatav analüsaator peab olema kohandatud selle meetodiga saadavate leeliseliste proovide mõõtmiseks.

56. Selle meetodi põhimõte seisneb selles, et pärast leelise lisamist ja loksutamist on anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon vabaruumis ebaoluline. Katsesüsteemis tuleks seda vähemalt üks kord kontrollida anorgaanilise süsiniku standardiga, leelise lisamise, tasakaalustamise ja anorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni mõõtmisega nii vabaruumis kui ka vedelfaasis (vt punkt 53). Kontsentratsioon vabaruumis peaks olema nullilähedane. Kõnealust CO_2 peaaegu täieliku neeldumise kontrolli ei ole vaja teha iga katse puhul.

57. Kui mõõdetakse lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist (ainult vees lahustuvad uuritavad kemikaalid), tuleks eraldi pudelite vedelfaasist (leelist lisamata) võtta proovid, filtrida membraanfiltriga ja süstida lahustunud orgaanilise süsiniku analüsaatorisse. Neid pudeleid võib vajaduse korral kasutada veel muudeks analüüsideks, et mõõta esmast biolagunemist.

▼M4

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste arvutamine

58. Kui eeldada uuritava kemikaali 100 % mineraliseerumist CO_2-ni, on kontrollnõus tekkivale CO_2-le lisandunud maksimaalne teoreetiliselt võimalik anorgaanilise süsiniku sisaldus (ThIC) võrdne igasse katsepudelisse katse alguses lisatud orgaanilise süsiniku kogusisaldusega (TOC), s.o:

$$\mathrm{ThIC} = \mathrm{TOC}$$

Anorgaanilise süsiniku kogumass TIC (mg) igas pudelis on:

$$\begin{aligned}\mathrm{TIC} &= (\text{mg C vedelikus} + \text{mg C vabaruumis}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H)\end{aligned} \qquad \text{võrrand 1,}$$

kus:

V_L = vedeliku kogus pudelis (liitrites);

C_L = anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon vedelikus (mg/l süsinikuna);

V_H = kogus vabaruumis (liitrites);

C_H = anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon vabaruumis (mg/l süsinikuna).

Anorgaanilise süsiniku kogumassi (TIC) arvutamist käesolevas katses anorgaanilise süsiniku mõõtmiseks kasutatud kahe analüüsimeetodi korral on kirjeldatud allpool punktides 60 ja 61. Biolagunemise protsent (*% D*) leitakse kummalgi juhul järgmiselt:

$$\%\mathrm{D} = \frac{(\mathrm{TIC_t} - \mathrm{TIC_b})}{\mathrm{TOC}} \times 100 \qquad \text{võrrand 2,}$$

kus:

TIC_t = anorgaanilise süsiniku kogumass (mg) katsepudelis ajal t;

TIC_b = keskmine anorgaanilise süsiniku kogumass (mg) kontrollpudelis ajal t;

TOC = katsenõusse algselt lisatud anorgaanilise süsiniku kogumass (mg).

Biolagunemise protsent % D arvutatakse katse (F_T), võrdluskatse (F_C) ja (kui seda kasutatakse) inhibeerimise seire kontrollkatse (F_I) pudelites kuni iga proovivõtuajani tekkinud anorgaanilise süsiniku kogumassi alusel.

59. Kui katse vältel suureneb oluliselt anorgaanilise süsiniku kogumass steriilsetes kontrollnõudes (F_S), siis võib järeldada, et uuritav kemikaal laguneb abiootiliselt, ja seda tuleb võrrandis 2 D arvutamisel arvesse võtta.

Hapestamine pH väärtusele < 3

60. Kuna hapestamisel pH väärtusele < 3 ja tasakaalustamisel muutuvad anorgaanilise süsiniku kogumassi kontsentratsioonid vedelfaasis ja gaasifaasis võrdseks, siis on vaja mõõta ainult gaasifaasi anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon. Seega saab võrrandi 1 alusel tuletada $\mathrm{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, kus V_B on seerumipudeli maht.

CO_2 muundamine karbonaadiks

61. Selle meetodi puhul tehakse arvutused võrrandi 1 järgi, aga ebaolulist anorgaanilise süsiniku kogust gaasifaasis ei võeta arvesse, s.o $V_H \times C_H = 0$, ja $\mathrm{TIC} = V_L \times C_L$.

▼M4

Tulemuste väljendamine

62. Biolagunemise kõvera saamiseks kantakse graafikule biolagunemise protsent D sõltuvalt inkubatsiooniajast ning võimaluse korral näidatakse ootefaas, biolagunemise faas, kümnepäevane ajavahemik ja platoofaas (s.o faas, kus on jõutud maksimaalse lagunemiseni ja biolagunemise kõver muutub horisontaalseks). Kui F_T paralleelkatsetes saadakse võrreldavad väärtused (erinevus < 20 %), koostatakse keskmistatud kõver (vt 2. liite joonis 1); kui tulemused ei ole võrreldavad, koostatakse kõver iga nõu kohta. Määratakse platoofaasi biolagunemise protsendi keskväärtus või hinnatakse suurim väärtus (näiteks kui kõver hakkab platoofaasis langema); viimati nimetatud juhul on tähtis kontrollida, et väärtus ei oleks võõrväärtus. Katseprotokollis tuleb see biolagunemise maksimaalne tase märkida kui „uuritava kemikaali biolagunemise määr". Kui katsenõude arv ei ole piisav platoofaasi kindlakstegemiseks, kasutatakse keskväärtuse arvutamiseks katse viimasel päeval mõõdetud andmeid. Viimane nimetatud väärtus, viie paralleelkatse keskmine, näitab biolagunemise protsendi määramise täpsust. Samuti tuleb registreerida kümnepäevase ajavahemiku lõpus saadud näitaja.

63. Samal viisil koostatakse võrdluskemikaali F_C biolagunemise kõver ning (kui seda kasutatakse) abiootilise kõrvaldamise kontrolli F_S ja inhibeerimise kontrolli F_I kõver.

64. Uuritava kemikaalita kontrollkatsetes (F_B) oleva anorgaanilise süsiniku kogumass registreeritakse; samuti toimitakse F_S (abiootiline kontroll) nõude puhul, kui katses kasutati kõnealuseid kontrollnõusid.

65. F_I nõude puhul arvutatakse D teoreetiliselt võimaliku anorgaanilise süsiniku tekkimise alusel, lähtudes ainult segus oleva võrdluskemikaali sisaldusest. Kui 28. päeval $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI)}\ (^2) / D_{FC}] \times 100 > 25$ %, siis võib eeldada, et uuritav kemikaal inhibeeris inokulumi tegevust, ja see võib seletada katse tingimustes saadud D_{FT} madalat väärtust. Sel juhul võib katset korrata, kasutades väiksemat uuritava kemikaali kontsentratsiooni ning eelistatavalt vähendades lahustunud anorgaanilise süsiniku sisaldust inokulumis ja uuritava kemikaalita kontrollnõudes tekkinud anorgaanilise süsiniku kogumassi, kuna vastasel juhul vähendab väiksem kontsentratsioon meetodi täpsust. Alternatiivselt võib kasutada muud inokulumi. Kui kolvis F_S (abiootiline) täheldatakse anorgaanilise süsiniku kogumassi olulist suurenemist (> 10 %), siis võis esineda abiootilist lagunemist.

Tulemuste kehtivus

▼M7

66. Katset peetakse nõuetekohaseks, kui:

a) võrdluskemikaali sisaldavates nõudes F_C on keskmine lagunemise protsent > 60 % inkubatsiooni 14. päevaks ja ning

b) kontrolli nõudes F_B on anorgaanilise süsiniku kogusisalduse keskmine kogus katse lõpus < 3 mg C/l.

Kui need piirmäärad ei ole täidetud, tuleks katset korrata muust allikast pärit inokulumiga ja/või kasutatud meetodid tuleks läbi vaadata. Näiteks kui probleem on rohke anorgaanilise süsiniku tekkimine kontrolli nõudes, tuleks kasutada punktides 27–32 kirjeldatud meetodit.

(1) Lagunemise protsent F_C nõudes, mis sisaldavad võrdlusainet.
(2) Lagunemise protsent F_I nõudes.

▼M4

67. Kui uuritava kemikaali lagundamisel ei saavuta 60 % teoreetiliselt maksimaalsest anorgaanilise süsiniku sisaldusest ja inhibeerivat mõju ei täheldatud (punkt 65), võib katset korrata inokulumi suurema kontsentratsiooniga (kuni 30 mg/l aktiivmuda ja 100 ml väljavoolu / l) või muudest allikatest saadud inokulumiga, eelkõige siis, kui lagunemine jäi vahemikku 20–60 %.

Tulemuste tõlgendamine

68. Selles katses näitab biolagunemine > 60 % teoreetiliselt maksimaalsest anorgaanilise süsiniku tasemest kümnepäevase ajavahemiku jooksul, et uuritav kemikaal on aeroobsetes tingimustes kiirelt biolagundatav.

69. Kui nõutud kriteerium – 60 % teoreetiliselt maksimaalsest anorgaanilise süsiniku kogusest – ei ole täidetud, määratakse pudelites oleva kasvukeskkonna pH (ilma hapestamata või leelistamata); väärtus alla 6,5 võib viidata nitrifikatsiooni toimumisele. Sel juhul tuleb katset korrata puhverlahuse suurema kontsentratsiooniga.

Katseprotokoll

70. Koostatakse tabel, milles on % D väärtused iga katse (F_T), võrdluse (F_C) ja (kui seda kasutati) inhibeerimise kontrollnõu (F_I) iga proovivõtu päeva kohta. Kui paralleelproovide pudelite kohta saadakse võrreldavad tulemused, siis koostatakse keskmise % D ajast sõltuvuse graafik. Registreeritakse anorgaanilise süsiniku kogumass kontrollnõudes (F_B) ja lahustunud orgaaniline süsinik ja/või muud näitajad steriilsetes kontrollnõudes (F_S) ning nende kõrvaldamise protsent.

71. Määratakse % D keskväärtus platoofaasis või suurim väärtus, kui biolagunemise kõver platoofaasis langeb, ning esitatakse see uuritava kemikaali lagunemise määrana. Tähtis on tagada, et viimati nimetatud juhul ei oleks suurim näitaja võõrväärtus.

72. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav kemikaal:

— tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— uuritava kemikaali puhtus (lisandid).

Katsetingimused:

— viide käesolevale katsemeetodile;

— kasutatud katsesüsteemi kirjeldus (näiteks nõu maht, vabaruumi ja vedeliku suhe, segamise meetod jne);

— uuritava kemikaali ja võrdluskemikaali lisamine katsesüsteemi: kasutatud kontsentratsioonid ja igasse katsepudelisse lisatud süsiniku kogus ning lahustite kasutamine;

— andmed kasutatud inokulumi kohta, iga eeltöötlemine ja kohandamine;

— inkubatsioonitemperatuur;

— anorgaanilise süsiniku analüüsi põhimõtte valideerimine;

— kasutatud anorgaanilise süsiniku analüsaatori (ja muude kasutatud analüüsimeetodite) peamised omadused;

— paralleelproovide arv.

Tulemused:

— mõõdetud biolagundatavuse andmed ja arvutatud väärtused tabeli kujul;

▼M4

— katse- ja võrdluskemikaali lagunemise protsendi sõltuvus ajast graafikuna, ootefaas, lagunemisfaas, kümnepäevane ajavahemik ja tõus;

— kõrvaldamise protsent platoofaasis, katse lõpus ja pärast kümnepäevast ajavahemikku;

— iga katsetulemuste arvestamata jätmise põhjendus;

— kõik muud andmed, mis on kasutatud katsemeetodi puhul asjakohased;

— tulemuste arutelu.

KIRJANDUS

1) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine – CO_2 eraldumise katse (meetod C.4-C)".

2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159–167.

3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153–1161.

4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195–1210.

5) ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922–929.

9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801–812.

10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181–185.

11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51–53.

12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233–243.

13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204–211.

14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507–524.

15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527–1550.

▼**M4**

16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO_2 headspace test).

17) Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813–1822.

18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219–3235.

20) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine".

21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

22) Käesoleva lisa peatükk C.11 „Aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse".

23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319–327.

24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

25) ISO 10634 (1996) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

1. liide

LÜHENDID JA MÕISTED

IC – anorgaaniline süsinik.

$ThCO_2$ – teoreetiline süsinikdioksiid (mg) on arvutuslik süsinikdioksiidi kogus, mis tekib uuritava kemikaali teadaolevast või mõõdetud süsinikusisaldusest uuritava kemikaali täielikul mineraliseerumisel; seda väljendatakse ka uuritava kemikaali mg kohta tekkinud süsinikdioksiidi mg-dena.

DOC – lahustunud orgaaniline süsinik (*dissolved organic carbon*) on lahuses olev orgaaniline süsinik või süsinik, mis läbib 0,45-mikromeetrise filtri või jääb supernatanti 15-minutilisel tsentrifuugimisel ligikaudu 4 000 g (ligikaudu 40 000 m/s^{-2}) juures.

DIC – lahustunud anorgaaniline süsinik (*dissolved inorganic carbon*).

ThIC – teoreetiline anorgaanilise süsiniku sisaldus (*theoretical inorganic carbon*).

TIC – anorgaanilise süsiniku kogusisaldus (*total inorganic carbon*).

Kiiresti biolagundatav – hinnanguline klassifikatsioon sellise kemikaali kohta, mis on läbinud konkreetsed kindlaks määratud lõpliku biolagunemise sõelumiskatsed; kõnealused katsed on nii ranged, et kõnealust kemikaali võib pidada kiiresti ja täielikult biolagundatavaks veekeskkonnas aeroobsetes tingimustes.

Kümnepäevane ajavahemik – 10 % biolagunemise saavutamisele vahetult järgnevad kümme päeva.

Iseeneslik biolagundatavus – klassifikatsioon kemikaalide kohta, mille (esmase või lõpliku) biolagunemise kohta on mis tahes biolagundatavuse katses saadud kindlad tõendid.

Täielik aeroobne biolagunemine – saavutatud lagunemise määr, mille korral mikroorganismid on uuritava kemikaali täielikult ära tarvitanud ja muutnud selle süsinikdioksiidiks, veeks, mineraalsooladeks ja uuteks mikroobirakkudeks (biomassiks).

Mineraliseerumine – mineraliseerumine on orgaanilise kemikaali täielik lagunemine CO_2-ks ja H_2O-ks aeroobsetes tingimustes ning CH_4-ks, CO_2-ks ja H_2O-ks anaeroobsetes tingimustes.

Ootefaas – aeg katse algusest kuni ajani, millal lagundava toimega mikroorganismid on aklimatiseerunud ja/või kohanenud ja uuritava kemikaali või orgaanilise aine biolagunemine on jõudnud avastatava tasemeni (näiteks 10 % maksimaalsest teoreetilisest biolagunemisest või vähem, olenevalt mõõtemeetodi täpsusest).

Lagunemisfaas – aeg ootefaasi lõpust ajani, mil on saavutatud 90 % maksimaalsest lagunemisest.

Platoofaas – platoofaas on faas, kus on jõutud maksimaalse lagunemiseni ja biolagunemise kõver muutub horisontaalseks.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

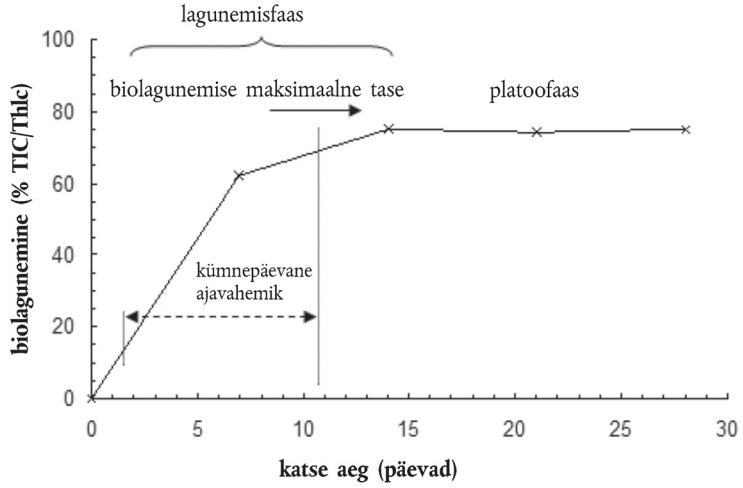
▼M4

2. liide

Biolagunemise kõvera näide

Joonis 1

1-oktanooli biolagunemine CO_2 vabaruumi katses



Mõisted

biolagunemine

lagunemisfaas

biolagunemise maksimaalne tase

platoofaas

kümnepäevane ajavahemik

katse aeg (päevad)

▼M4

C.30. **BIOAKUMULATSIOON MULLA VÄHEHARJASUSSIDES**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 317 (2010). Keskkonnale avalduva mõjuga seotud katsemeetoditest avaldati „Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse" (käesoleva lisa peatükk C.13 (49)) ja „Bioakumulatsioon setetes elavates põhjaloomadest väheharjasussides" (53) vastavalt 1996. aastal ja 2008. aastal. Vesikeskkonna bioakumulatsiooni andmete ekstrapoleerimine sellistele mullaorganismidele nagu vihmaussid on keeruline, kui üldse võimalik. Uuritava kemikaali lipofiilsusel põhinevaid mudelarvutusi, vt näiteks kirjanduse loetelust 14 ja 37, kasutatakse praegu mullas toimuva kemikaalide bioakumulatsiooni hindamiseks, näiteks ELi tehnilises juhenddokumendis (19). Keskkonnaosa-põhise katsemeetodi vajadusega on juba tegeldud, vt näiteks 55. Selline meetod on eelkõige tähtis teisese mürgisuse hindamiseks mullas elavate loomade toiduahelates (4). Mitmes riiklikus katsemeetodis käsitletakse bioakumulatsiooni muudes organismides kui kalad, vt näiteks kirjanduse loetelust 2 ja 72. USA Materjalide Katsetamise Ühing (3) on välja töötanud meetodi bioakumulatsiooni mõõtmiseks saastunud mullas elavates vihmaussides (*Eisenia fetida,* Savigny) ja valgeliimuklastes. Rahvusvaheliselt tunnustatud meetod bioakumulatsiooni määramiseks rikastatud mullas parandab kemikaalide riskihindamist maapealsetes ökosüsteemides (vt näiteks 25, 29).

2. Mulda söövad selgrootud puutuvad kokku mullas olevate kemikaalidega. Nende loomade hulgas on mulla väheharjasussidel mulla struktuuri ja toime säilitamisel tähtis osa (15, 20). Mulla väheharjasussid elavad mullas ja osaliselt maapinnal (eelkõige metsavarise kihis); nad on biomassi mõistes sageli kõige rikkalikum liik (54). Mulla bioturbatsiooni teel ja olles toiduks teistele loomadele võivad need loomad suurel määral mõjutada kemikaalide biosaadavust muudele organismidele, nagu selgrootud röövloomad (näiteks röövlestad ja -põrnikad (näiteks 64) või selgroogsed röövloomad (näiteks rebased ja kajakad) (18, 62). Mõnd mulla väheharjasusside liiki, keda praegu ökotoksikoloogilistes katsetes kasutatakse, on kirjeldatud 5. liites.

3. USA Materjalide Katsetamise Ühingu standardjuhend mulla mürgisuse või bioakumulatsiooni laborikatsete tegemise kohta *Lumbricidae* sugukonda kuuluva vihmaussiga *Eisenia fetida* ja *Enchytraeidae* sugukonda kuuluva valgeliimukaga *Enchytraeus albidus* (3) annab palju üliolulisi ja kasulikke andmeid käesoleva mullas toimuva bioakumulatsiooni katsemeetodi kasutamise kohta. Käesolevas katsemeetodis viidatud täiendavad dokumendid on käesoleva lisa peatükk C.13 „Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse" (49) ja OECD katsejuhend nr 315 „Bioakumulatsioon setetes elavates põhjaloomadest väheharjasussides" (53). Käesoleva katsemeetodi jaoks on tähtsad teabeallikad ka praktilised kogemused mulla bioakumulatsiooni uuringutega ja asjaomased väljaanded (näiteks 1, 5, 11, 12, 28, 40, 43, 45, 57, 59, 76, 78, 79).

4. Käesolev katsemeetod on peamiselt kasutatav stabiilsete neutraalsete orgaaniliste kemikaalide puhul, mis kalduvad adsorbeeruma mullal. Käesoleva katsemeetodi abil võib olla võimalik uurida mullaga seonduvate stabiilsete metallorgaaniliste ühendite bioakumulatsiooni. Seda saab kasutada ka metallide ja muude mikroelementide puhul.

EELTINGIMUSED

5. Mulla väheharjasussides kemikaali bioakumulatsiooni mõõtmise katseid on tehtud raskmetallidega (vt näiteks 63) ja püsivate orgaaniliste kemikaalidega, millel on väike log K_{ow} väärtus vahemikus 3,0–6,0, vt näiteks 40. Neid katseid kasutatakse järgmiste ainete puhul:

— kemikaalid, mille log K_{ow} on suurem kui 6,0 (väga hüdrofoobsed kemikaalid);

▼M4

— kemikaalid, mis kuuluvad teadaolevalt elusorganismides bioakumuleeruda võivate orgaaniliste kemikaalide hulka, näiteks pindaktiivsed või väga suure adsorptsioonivõimega kemikaalid;

— kemikaalid, mille struktuuri alusel võib oletada bioakumulatsiooni, näiteks teadaolevalt bioakumuleeruvate kemikaalide analoogid;

— metallid.

6. Enne uuringu alustamist tuleks uuritava kemikaali kohta teha kindlaks sellised andmed nagu tavanimetus, keemiline nimetus (eelistatavalt Rahvusvahelise Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liidu (IUPAC) nimetus), struktuurivalem, CASi registreerimisnumber, puhtus, ohutusabinõud, säilitamistingimused ja analüüsimeetodid. Lisaks peaks olema teada järgmine teave:

a) lahustuvus vees;

b) oktanooli/vee jaotuskoefitsient, K_{ow};

c) mulla/vee jaotuskoefitsient, K_{oc};

d) aururõhk;

e) lagunduvus (näiteks mullas, vees);

f) teada olevad metaboliidid.

7. Võib kasutada radiomärgistatud või radiomärgistamata uuritavat kemikaali. Analüüsi lihtsustamiseks soovitatakse siiski kasutada radiomärgistatud kemikaali. Otsus tehakse tuvastuspiiride alusel või lähtudes sellest, kas on vaja mõõta uuritavat lähtekemikaali ja metaboliite. Kui kasutatakse radiomärgistatud uuritavat kemikaali ja mõõdetakse radioaktiivsete jääkide kogusisaldust, siis on tähtis, et mullas ja katseorganismis leiduvates radiomärgisega jääkides määrataks uuritava lähtekemikaali panus ja muude märgisega kemikaalide panus, näiteks statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus võetud proovides, et oleks võimalik arvutada uuritava lähtekemikaali ja asjakohaste mulla metaboliitide bioakumulatsioonitegur (vt punkt 50). Siin kirjeldatud meetodit võib olla vaja muuta, näiteks selleks, et tagada piisav biomass radiomärgistamata orgaanilise uuritava kemikaali või metallide mõõtmiseks. Kui mõõdetakse radioaktiivsete jääkide kogusisaldust (vedelik-stsintillatsiooni loenduriga pärast ekstraheerimist, põletamist või koe lahustamist), põhineb bioakumulatsioonitegur uuritaval lähtekemikaalil ja metaboliitidel. Eelistatavalt peaks bioakumulatsiooniteguri arvutamine põhinema uuritava lähtekemikaali kontsentratsioonil organismides ja radioaktiivsete jääkide kogusisaldusel. Seejärel tuleks arvutada bioakumulatsiooniteguri alusel elustiku-mulla akumulatsioonitegur, mis on normeeritud ussi lipiidisisalduse ja mulla orgaanilise süsiniku sisalduse järgi, et erinevate bioakumulatsiooni katsete tulemusi oleks võimalik võrrelda.

8. Peaks olema teada uuritava kemikaali mürgisus katses kasutatava liigi jaoks, näiteks toimet avaldav kontsentratsioon (ECx) või letaalne kontsentratsioon (LCx) omastamisfaasis (vt näiteks 19). Kasutatava analüüsimeetodi järgi tuleks uuritava kemikaali kontsentratsioon valida nii, et see oleks eelistatavalt ligikaudu 1 % kemikaali ägedast asümptootilisest LC_{50} väärtusest ja vähemalt kümme korda suurem kui kemikaali tuvastamispiir mullas. Andmete olemasolu korral tuleks eelistada subletaalsete näitajate pikaajaliste uuringutega saadud mürgisusnäitajaid (51, 52). Kui selliseid andmeid ei ole, annab kasulikku teavet ägeda mürgisuse katse (vt näiteks 23).

▼M4

9. Kättesaadav peaks olema asjakohane teadaoleva täpsuse ja tundlikkusega analüüsimeetod kemikaali kvantitatiivse sisalduse mõõtmiseks katselahustes, mullas ja bioloogilises materjalis, samuti andmed proovi valmistamise ja säilitamise kohta ning materjali ohutuskaardid. Samuti peaksid teada olema uuritava aine analüütilised tuvastuspiirid mullas ja usside kudedes. Kui kasutatakse ^{14}C-märgisega uuritavat kemikaali, peaks olema teada eriradioaktiivsus (s.o Bq mol^{-1}) ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsent. Uuritava kemikaali eriradioaktiivsus peaks olema piisavalt suur, et võimaldada analüüsi, ja katses kasutatavad kontsentratsioonid ei tohiks olla mürgised.

10. Katset on võimalik teha tehismullaga või loodusliku mullaga. Enne katse algust tuleks teada kasutatava loodusliku mulla omadusi, näiteks mulla või selle koostisosade päritolu, pH-d, orgaanilise süsiniku sisaldust, osakeste suurusjaotust (liiva, tolmu ja savi protsent) ning veemahutavust (3, 48).

KATSE PÕHIMÕTE

11. Uuritava kemikaali bioakumulatsiooni iseloomustavate parameetrite hulka kuuluvad bioakumulatsioonitegur, omastamise kiiruskonstant (k_s) ja kõrvaldamise kiiruskonstant (k_e). Mõisted on esitatud 1. liites.

12. Katse koosneb kahest faasist: omastamise (kokkupuute) faas ja kõrvaldamise (kokkupuutejärgne) faas. Omastamisfaasi ajal puutuvad paralleelproovide usside rühmad kokku mullaga, mida on rikastatud uuritava kemikaaliga. Lisaks katseloomadele hoitakse identsetes tingimustes, aga ilma uuritava kemikaalita, usside kontrollrühmi. Mõõdetakse katseorganismide kuivkaalu ja lipiidisisaldust. Seda võib teha kontrollrühma ussidega. Kontrollrühma usside ja mullaproovide analüüsimise teel on võimalik leida analüütilised taustanäitajad (kontrollnäitajad). Kõrvaldamisfaasi ajaks kantakse ussid üle uuritava kemikaalita mulda. Kõrvaldamisfaas on alati vajalik, v.a juhul, kui kokkupuutefaasi ajal uuritavat kemikaali oluliselt ei omastatud. Kõrvaldamisfaas annab teavet kiiruse kohta, millega uuritavat kemikaali katseorganismidest väljutatakse (vt näiteks 27). Kui omastamisfaasi ajal statsionaarse olekuni ei jõuta, peaks kineetiliste parameetrite (kineetiline bioakumulatsioonitegur, omastamise ja kõrvaldamise kiiruskonstant/-konstandid) määramine põhinema eelistatavalt omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi tulemuste samaaegsel sobitamisel kineetilise mudeliga. Uuritava kemikaali kontsentratsiooni ussides/ussidel jälgitakse katse kõigi faaside vältel.

13. Omastamisfaasi ajal tehakse mõõtmisi proovivõtu aegadel kuni 14 päeva (valgeliimuklased) või 21 päeva (vihmaussid), kuni on jõutud statsionaarse olekuni (11, 12, 67). Statsionaarne olek on saavutatud, kui ussides oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse graafik jääb ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevase vahemikuga võetud kolme järjestikuse proovi kontsentratsioonianalüüsi tulemused ei erine üksteisest statistiliste võrdluste (näiteks variatsioonanalüüs, regressioonanalüüs) alusel rohkem kui ±20 %.

14. Kõrvaldamisfaas hõlmab katseorganismide ülekandmist nõudesse, mis sisaldavad sama substraati ilma uuritava kemikaalita. Kõrvaldamisfaasi ajal tehakse mõõtmisi proovivõtu aegadel 14 päeva vältel (valgeliimuklased) või 21 päeva vältel (vihmaussid), v.a juhul, kui varasemad analüütilised määramised näitasid uuritava kemikaali jääkide 90 % vähenemist ussides. Uuritava kemikaali kontsentratsioon ussides kõrvaldamisfaasi lõpus teatatakse kõrvaldamata jääkidena. Statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur

▼M4

arvutatakse eelistatavalt ussides oleva kontsentratsiooni (Ca) ja mullas oleva kontsentratsiooni (Cs) suhtena näilise statsionaarse oleku korral ja ka kineetilise bioakumulatsioonitegurina, mis on mullast omastamise kiiruskonstandi (k_s) ja kõrvaldamise kiiruskonstandi (k_e) (vt mõisted, 1. liide) suhe; seejuures eeldatakse esimest järku reaktsiooni kineetikat (vt arvutused, 2. liide). Kui esimest järku reaktsiooni kineetika ei ole ilmselgelt kohaldatav, tuleks kasutada muid mudeleid.

15. Omastamise kiiruskonstant, kõrvaldamise kiiruskonstant (või muude mudelitega seotud konstandid), kineetiline bioakumulatsioonitegur ja võimaluse korral iga nimetatud parameetri usalduspiirid arvutatakse teoreetilise mudeli võrranditest (vt juhised, 2. liide). Mudeli sobivust katseandmetega saab hinnata näiteks korrelatsioonikordaja või determinatsioonikordaja järgi (kui kordaja läheneb 1-le, kirjeldab mudel katseandmeid hästi) või hii-ruut-testiga. Mudeli sobivust võib samuti näidata määratava parameetri standardhälbe või usaldusvahemiku suurus.

16. Väga lipofiilse uuritava kemikaali katsetulemuste varieeruvuse vähendamiseks tuleks bioakumulatsioonitegureid väljendada lipiidisisalduse ja orgaanilise süsiniku sisalduse suhte alusel (kg mulla orgaanilist süsinikku ussi lipiidisisalduse kg kohta). See lähenemisviis põhineb asjaolul, et mõne kemikaaliklassi puhul on bioakumulatsiooni tõenäosus selgelt seotud lipofiilsusega; kalade puhul on see täpselt kindlaks tehtud (47). Kõnealuste kemikaalide bioakumulatsioon sõltub kalade lipiidisisaldusest. Põhjaloomade puhul on leitud samalaadseid korrelatsioone, vt näiteks 30, 44. See korrelatsioon on samuti tõendatud mulla väheharjasusside puhul, vt näiteks 5, 6, 7, 14. Kui usside biomassi on piisavalt, saab katseloomade lipiidisisalduse määrata samast bioloogilisest materjalist, millest määrati uuritava kemikaali kontsentratsiooni. Alternatiivselt võib lipiidisisalduse mõõtmiseks kasutada kontrollrühma loomi.

KATSE KEHTIVUS

17. Katse kehtivuse tagamiseks peavad nii kontrollrühmade kui ka katserühmade puhul olema täidetud järgmised kriteeriumid:

— katse lõpus ei tohiks kogusuremus omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajal ületada 10 % (vihmaussid) või 20 % (valgeliimuklased) kasutatud usside koguarvust;

— *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* puhul ei tohiks omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi lõpus mõõdetud keskmine massi kadu ületada 20 % võrreldуna algse toorkaaluga kummagi faasi alguses.

MEETODI KIRJELDUS

Katses kasutatavad liigid

18. Bioakumulatsiooni katsetamisel soovitatakse kasutada mitut mulla väheharjasusside liiki. Enim kasutatavaid liike *Eisenia fetida* või *Eisenia andrei (Lumbricidae)* või *Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus* või *Enchytraeus luxuriosus (Enchytraeidae)* on kirjeldatud 5. liites.

▼M4

Seadmed

19. Tuleks olla tähelepanelik, et vältida seadmete kõigis osades selliste materjalide kasutamist, mis võivad lahustuda, uuritavat kemikaali adsorbeerida või muid kemikaale eraldada ja avaldada katseloomadele kahjulikku mõju. Kooskõlas koormuse määraga, s.o katseusside arvuga, võib kasutada tavapäraseid ristkülikukujulisi või silindrilisi nõusid, mis on valmistatud keemiliselt inertsest materjalist ja on sobiva mahuga. Katse kasvukeskkonnaga kokku puutuvates seadmetes võib kasutada roostevaba terast, plastikut või klaasi. Katsenõud peaksid olema korralikult kaetud, et vältida usside põgenemist, võimaldades samas piisavat õhuvarustust. Suure adsorptsioonikoefitsiendiga kemikaalide korral (näiteks sünteetilised püretroidid) võib olla vaja kasutada silaanitud klaasi. Sellistel juhtudel tuleb seadmed pärast kasutamist ära visata (49). Tuleks takistada radiomärgistatud uuritavate ainete ja lenduvate kemikaalide väljapääsemist. Katsenõudest auruvate jääkide väljapääsemise vältimiseks tuleks kasutada separaatoreid (näiteks klaaspudelid gaasi pesemiseks), mis sisaldavad sobivaid absorbente.

Muld

20. Katsemuld peaks olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab katseorganismidel selles elada ja eelistatavalt paljuneda aklimatiseerumise ja katse ajavahemike vältel, ilma et neil tekiks ebatavalisi muutusi välimuses või ebatavalist käitumist. Ussid peaksid saama mulda kaevuda.

21. Katsetes soovitatakse substraadina kasutada käesoleva lisa peatükis C.8 (48) kirjeldatud tehismulda. Bioakumulatsiooni katsetes kasutatava tehismulla valmistamine ja soovitused tehismulla säilitamiseks on esitatud 4. liites. Õhu käes kuivatatud tehismulda võib kuni kasutamiseni säilitada toatemperatuuril.

22. Katsemullana ja/või kultuuri kasvumullana võib siiski kasutada looduslikku mulda saastumata kohtadest. Loodusliku mulla kirjeldamisel tuleks esitada vähemalt järgmised andmed: päritolu (võtmise koht), pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsent), maksimaalne veemahutavus ja veesisalduse protsent (3). Kasulikku teavet peaks andma mulla või selle koostisosade mikrosaasteainete analüüsi tegemine enne kasutamist. Kui kasutatakse põllumulda, siis ei tohiks seda olla töödeldud taimekaitsevahenditega ega väetatud töödeldud loomade sõnnikuga vähemalt üks aasta ning orgaanilise väetisega vähemalt kuus kuud enne proovivõttu (50). Loodusliku mulla käsitlemise meetodeid enne väheharjasussidega tehtavates ökotoksikoloogilistes laborikatsetes kasutamist on kirjeldatud väljaandes 3. Loodusliku mulla puhul tuleks laboris säilitamise aeg hoida võimalikult lühikesena.

Uuritava kemikaali kasutamine

23. Uuritav kemikaal viiakse mulla sisse. Seejuures tuleks arvesse võtta kemikaali füüsikalis-keemilisi omadusi. Vees lahustuv uuritav kemikaal tuleks enne mullaga segamist vees täielikult lahustada. Halvasti vees lahustuva uuritava kemikaali puhul soovitatakse üks või mitu (tehisliku) mulla koostisosa katta uuritava kemikaaliga. Näiteks kvartsliiva või osa sellest võib immutada sobivas orgaanilises lahustis lahustatud uuritava kemikaaliga; seejärel aurustatakse lahusti aeglaselt kuni kuivamiseni. Kemikaaliga kaetud mullakomponendi saab seejärel segada niiske mulla sisse. Selle meetodi

▼M4

peamine eelis on see, et lahustit mulda ei lisata. Kui kasutatakse looduslikku mulda, võib uuritavat kemikaali lisada mulla õhu käes kuivatatud osa rikastamise teel, nagu on kirjeldatud eespool tehisliku mulla puhul, või uuritava kemikaali ja niiske mulla segamisega, kasutades seejärel aurustamise etappi (kui kasutatakse lahustit). Üldiselt tuleks võimaluste piires vältida niiske mulla kokkupuudet lahustitega. Arvestada tuleks järgmist (3):

— kui vee asemel kasutatakse muud lahustit, peaks see olema veega segunev ja/või seda peaks olema võimalik kõrvaldada (näiteks aurustada), nii et mulda jääb ainult uuritav kemikaal;

— kui kasutatakse lahusti kontrollrühma, ei ole negatiivne kontrollrühm vajalik. Lahusti kontrollkatses tuleks kasutada mullale lisatud lahusti suurimat kontsentratsiooni ja lahusti peaks olema samast partiist, mida kasutati põhilahuse valmistamisel. Sobiva lahusti valimisel peaksid peamised kriteeriumid olema lahusti mürgisus ja lenduvus ning uuritava kemikaali lahustuvus valitud lahustis.

24. Vees ja orgaanilistes lahustites halvasti lahustuva kemikaali korral võib soovitud katsekontsentratsiooni saamiseks segada uuritava kemikaali kogusega 2,0–2,5 g (näiteks uhmri ja nuia abil) peeneks jahvatatud kvartsliiva katsenõu kohta. See kvartsliiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelnevalt niisutatud mullale ning segatakse sellega põhjalikult läbi ja lisatakse vajalik kogus deioniseeritud vett, et saada sobiv niiskusesisaldus. Lõplik segu jaotatakse katsenõudesse. Protseduuri korratakse iga katsekontsentratsiooni puhul ja samuti valmistatakse ette sobiv kontrollkatsenõu, kus on 2,0–2,5 g peeneks jahvatatud kvartsliiva katsenõu kohta.

25. Pärast rikastamist tuleks määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon mullas. Enne katseorganismide lisamist tuleks kontrollida, et uuritav kemikaal oleks mullas jaotunud ühtlaselt. Katseprotokollis kirjeldatakse rikastamiseks kasutatud meetodit ja esitatakse konkreetse rikastamismeetodi valimise põhjused (24).

26. Ideaaljuhul tuleks enne organismide lisamist kindlaks teha, et mulla- ja pooriveefaasi vahel on tekkinud tasakaaluolek; soovituslik on neljapäevane ajavahemik 20 °C juures. Vees halvasti lahustuva orgaanilise kemikaali puhul võib adsorbeerunud ja lahustunud fraktsiooni tegeliku tasakaaluolekuni jõudmiseks kuluda päevi või kuid. Olenevalt uuringu eesmärgist, näiteks keskkonnatingimuste imiteerimisel, võib rikastatud mulda vanandada kauem, näiteks metallide puhul kolm nädalat temperatuuril 20 °C (22).

Katseorganismide kultuurid

27. Usse tuleks eelistatavalt pidada alalises laborikultuuris. Suunised *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* ning *Enchytraeidae* sugukonna liikide laborikultuuri meetodite kohta on esitatud 5. liites (vt ka 48, 51, 52).

28. Katsetes kasutatavatel ussidel ei tohiks olla nähtavaid haigusi, hälbeid ega parasiite.

KATSE KÄIK

29. Katseorganismid puutuvad uuritava kemikaaliga kokku omastamisfaasi ajal. Omastamisfaasi kestus peaks olema 14 päeva (valgeliimuklased) või 21 päeva (vihmaussid), v.a juhul, kui tõendatakse statsionaarse olekuni jõudmist.

▼M4

30. Kõrvaldamisfaasi ajaks kantakse ussid üle uuritava kemikaalita mulda. Esimene proov tuleks võtta 4–24 tunni möödumisel kõrvaldamisfaasi algusest. 21-päevase omastamisfaasi ja 21-päevase kõrvaldamisfaasi proovivõtu ajakavade näidised on esitatud 3. liites.

Katseorganismid

31. Mitme mulla valgeliimuklase liigi isendi kaal on väga väike (näiteks märgkaal 5–10 mg isendi kohta *Enchytraeus albidus'*e puhul ja veel väiksem *Enchytraeus crypticus'*e või *Enchytraeus luxuriosus'*e puhul); kaalu mõõtmiseks ja keemiliste analüüside tegemiseks võib olla vaja koondada paralleelproovi katsenõude ussid (s.o ühe koeanalüüsi tulemuse saamiseks kasutatakse kõiki paralleelproovi nõu usse). Igale paralleelproovile lisatakse 20 valgeliimuklase isendit ja kasutada tuleks vähemalt kolme paralleelproovi. Kui uuritava kemikaali analüütiline tuvastuspiir on kõrge, võib osutuda vajalikuks kasutada rohkem usse. Suurema isendi massiga katseliikide (*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei*) korral võib kasutada ühte isendit sisaldavaid paralleelproovide nõusid.

32. Katses kasutatavad vihmaussid peaksid olema sarnase massiga (näiteks *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* isendi mass peaks olema 250–600 mg). Valgeliimuklaste (näiteks *Enchytraeus albidus'*e) pikkus peaks olema ligikaudu 1 cm. Kõik konkreetses katses kasutatavad ussid peaksid olema sama päritoluga ja tegemist peaks olema *clitellum'*iga täiskasvanud isenditega (vt 5. liide). Kuna looma mass ja vanus võivad bioakumulatsioonitegurit mõjutada (näiteks erineva lipiidisisalduse ja/või munade olemasolu tõttu), tuleks need parameetrid täpselt registreerida ja neid tuleks tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta. Lisaks sellele võivad kokkupuutefaasi vältel lisanduda kookonid, mis mõjutavad samuti bioakumulatsioonitegurit. Keskmiste märg- ja kuivmasside hindamiseks soovitatakse enne katset kaaluda katseusside alamproovi.

33. Tuleks kasutada suurt mulla ja usside suhtarvu, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni vähenemine mullas omastamisfaasi ajal oleks minimaalne. *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* korral on soovituslik vähemalt 50 g mulla kuivmassi ussi kohta ja valgeliimuklaste puhul vähemalt 10–20 g mulla kuivmassi katsenõu kohta. Nõud peaksid sisaldama 2–3 cm (valgeliimuklased) või 4–5 cm (vihmaussid) mullakihti.

34. Katses kasutatud ussid kõrvaldatakse kultuurist (näiteks valgeliimuklased juveliiripintsettide abil). Täiskasvanud isendid kantakse üle töötlemata katsemulda aklimatiseerumiseks ja neid söödetakse (vt punkt 36). Kui katsetingimused erinevad kultuuri tingimustest, peaks ussidele katsetingimustega kohanemiseks piisama 24–72-tunnisest aklimatiseerumisfaasist. Pärast aklimatiseerumist loputatakse vihmausse, tõstes nad puhta veega klaasnõusse (näiteks Petri tassile), ja seejärel kaalutakse vihmaussid enne katsemulda panemist. Enne kaalumist tuleks liigne vesi ussi küljest kõrvaldada, puudutades ussiga õrnalt tassi serva või kuivatades ettevaatlikult veidi niisutatud paberrätikuga.

35. Tuleks jälgida katseorganismide kaevumiskäitumist ja see tuleks registreerida. Vihmaussidega tehtavates katsetes kaevuvad loomad (kontrollrühmas ja töötlusrühmas) tavaliselt paari tunniga mulla sisse; seda tuleks kontrollida usside katsenõudesse panemisest hiljemalt 24 tunni möödumisel. Kui vihmaussid mulda ei kaevu (näiteks omastamisfaasist rohkem kui poole

▼M4

mõõdumisel rohkem kui 10 %), siis see näitab, et kas ei ole katsetingimused sobivad või ei ole katseorganismid terved. Sellisel juhul tuleks katse peatada ja seda tuleks korrata. Valgeliimuklased elavad peamiselt mullaosakestevahelistes poorides ja nende välispind võib ümbritseva substraadiga sageli ainult osaliselt kokku puutuda; kaevunud ja mittekaevunud valgeliimuklaste kokkupuude eeldatakse olevat samaväärne ning eeldatakse, et valgeliimuklaste mittekaevumise puhul ei pruugi katse kordamine vajalik olla.

Söötmine

36. Vähese orgaanilise süsiniku kogusisaldusega mulla kasutamise korral tuleks ette näha söötmine. Tehismulla kasutamise korral soovitatakse vihmaussidele iga nädal (s.o usse tuleks sööta kord nädalas) sööta 7 mg kuivatatud sõnnikut mulla kuivmassi g kohta ja valgeliimuklaste puhul iga nädal 2–2,5 mg jahvatatud kaerahelbeid mulla kuivmassi g kohta (11). Esimene söödakogus tuleks segada mullaga vahetult enne katseorganismide lisamist. Eelistatavalt tuleks kasutada sama tüüpi sööta, mida kasutatakse kultuuris (vt 5. liide).

Valgus ja temperatuur

37. Katse tuleks teha kontrollitud valgustustsükliga 16 tundi valgust / 8 tundi pimedust, valgustatus katsenõu piirkonnas eelistatavalt 400–800 luksi (3). Katsetemperatuur peaks olema kogu katse vältel 20 ± 2 °C.

Katsekontsentratsioonid

38. Kasutatakse ühte kontsentratsiooni. Täiendava(te) kontsentratsiooni(de) kasutamise vajadust tuleks põhjendada. Kui uuritava kemikaali mürgisus (ECx) on ligilähedane analüütilise tuvastuspiiriga, siis on soovitatav kasutada suure eriradioaktiivsusega radiomärgistatud uuritavat kemikaali. Metallide puhul peaks kontsentratsioon ületama koe ja mulla tausttaset.

Paralleelproovid

39. Kineetiliste mõõtmiste puhul (omastamisfaas ja kõrvaldamisfaas) peaks kemikaaliga töödeldud paralleelproovide arv olema vähemalt kolm iga proovivõtupunkti kohta. Ettevalmistatud paralleelproovide koguarv peaks olema piisav, et hõlmata kõik proovivõtuajad omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajal.

40. Kui lahustina kasutatakse ainult vett, tuleks bioloogiliste vaatluste ja mõõtmiste jaoks (näiteks kuiv- ja märgmassi suhe, lipiidisisaldus) ning usside ja mulla taustkontsentratsioonide analüüsiks ette näha vähemalt 12 negatiivse kontrollrühma paralleelproovinõu (millest neljast võetakse proov alguses, neljast omastamise lõpus ja neljast kõrvaldamise lõpus). Kui uuritava kemikaali lisamiseks kasutatakse lahustavat ainet, tuleks lisaks kemikaaliga töödeldud paralleelproovidele kasutada ka lahusti kontrollrühma (neljast paralleelproovi nõust tuleks võtta proov alguses, neljast omastamisfaasi lõpus ja neljast kõrvaldamisfaasi lõpus), mis hõlmab kõiki koostisosi peale uuritava aine. Sel juhul võib samuti ette näha negatiivse kontrollrühma neli täiendavat paralleelproovi nõud (ilma lahustita) valikuliseks proovivõtuks omastamisfaasi lõpus. Neid paralleelproove võib võrrelda bioloogiliselt lahusti kontrollrühmaga, et saada teavet lahusti võimaliku mõju kohta katseorganismile. Soovitatakse ette näha piisav kogus täiendavaid paralleelproovi varunõusid (näiteks kaheksa) kemikaaliga töötlemise ja kontrollrühma(de) jaoks.

▼M4

Mulla kvaliteedi mõõtmise sagedus

41. Mulla pH-d, niiskusesisaldust ja temperatuuri (pidevalt) katseruumis tuleks mõõta omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi alguses ja lõpus. Kord nädalas tuleks kontrollida mulla niiskusesisaldust, kaaludes katsenõusid ja võrreldes tegelikku massi katse alguse esialgse massiga. Veekadu tuleks kompenseerida deioniseeritud vee lisamisega.

Usside ja mulla proovide võtmine ja analüüsimine

42. Vihmausside ja valgeliimuklaste bioakumulatsiooni katsete omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajakava näidis on esitatud 3. liites.

43. Katsenõudest võetakse mullaproov, et määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon enne usside lisamist ning omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajal. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid ussides ja mullas. Tavaliselt mõõdetakse mulla kogukontsentratsioone. Soovi korral võib mõõta poorivee kontsentratsioone; sel juhul tuleks enne uuringu alustamist formuleerida põhjendus ja ette näha asjakohased meetodid ning esitada need katseprotokollis.

44. Ussidest ja mullast võetakse proovid vähemalt kuuel korral omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi vältel. Kui on tõendatud, et uuritav kemikaal on stabiilne, võib mullaproovide arvu vähendada. Omastamisfaasi alguses ja lõpus soovitatakse analüüsida vähemalt kolme paralleelproovi. Kui omastamisfaasi lõpus mõõdetud kontsentratsioon mullas erineb algsest kontsentratsioonist rohkem kui 30 %, tuleks analüüsida ka muudel kuupäevadel võetud mullaproove.

45. Kõrvaldage konkreetse paralleelproovi ussid igal proovivõtukorral mullast (näiteks pärast paralleelproovi mulla laotamist madalale alusele ja kasutades usside tõstmiseks pehmeid juveliiripintsette) ja loputage neid kiiresti veega madalas klaasis või terasalusel. Eemaldage liigne vesi (vt punkt 34). Tõstke ussid ettevaatlikult eelnevalt kaalutud nõusse ja kaaluge nad, sh nende soolestiku sisu, viivitamata.

46. Vihmaussidel (*Eisenia* sp.) tuleks lasta seejärel oma soolestiku sisu öö jooksul väljutada, näiteks kaetud Petri tassil olevale niiskele filterpaberile (vt punkt 34). Pärast väljutamist tuleks teha kindlaks usside kaal, et hinnata katse vältel võimalikku biomassi vähenemist (vt kehtivuse kriteeriumid punktis 17). Valgeliimuklaste kaalumine ja kudede analüüs viiakse ellu ilma väljutamiseta, kuna see on nende usside väiksuse tõttu tehniliselt keerukas. Pärast lõplikku massi määramist tuleks ussid viivitamata kõige asjakohasema meetodi abil surmata (näiteks vedela lämmastiku abil või külmutamisega temperatuurini alla –18 °C).

47. Kõrvaldamisfaasi ajal asendavad ussid saastunud soolestiku sisu puhta mullaga. See tähendab, et vahetult enne kõrvaldamisfaasi võetud väljutamata soolestiku sisuga usside (praegusel juhul valgeliimuklased) proovid sisaldavad saastunud mulda. Veekeskkonna väheharjasusside puhul eeldatakse, et pärast esialgset 4–24-tunnist kõrvaldamisfaasi on enamik saastunud soolestiku sisust asendatud puhta settega, vt näiteks 46. Samalaadsetest tulemustest on teatatud vihmausside puhul radiomärgistatud kaadmiumi ja tsingi akumulatsiooni uuringutes (78). Väljutamata soolestiku sisuga valgeliimuklaste puhul võidakse käsitada kõnealust kõrvaldamisfaasi esimese proovi kontsentratsiooni kui kudede kontsentratsiooni pärast soolestiku tühjendamist. Uuritava aine kontsentratsiooni saastamata mullast tingitud lahjenemise arvessevõtmiseks kõrvaldamisfaasis võib hinnata soolestikusisalduse massi ussi märgmassist / ussi tuha massist või ussi kuivmassi / ussi tuha massi suhetest.

▼M4

48. Mulla- ja ussiproove tuleks eelistatavalt analüüsida viivitamata pärast kõrvaldamist (s.o 1–2 päeva jooksul), et vältida lagunemist või muid kadusid, ja katse vältel on soovitatav arvutada ligikaudseid omastamis- ja kõrvaldamismäärasid. Kui analüüs tehakse hiljem, tuleks proove säilitada sobiva meetodi abil, näiteks sügavkülmutamise teel (≤ –18 °C).

49. Tuleks kontrollida, et keemilise analüüsi täpsus ja reprodutseeritavus ning uuritava kemikaali saagis mulla- ja ussiproovidest oleks kõnealuse meetodi jaoks rahuldav; tuleks registreerida ekstraktsiooni tõhusus, tuvastuspiir ja määramispiir. Samuti tuleks kontrollida, et kontrollnõudes ei oleks uuritava kemikaali kontsentratsioon suurem tausttasemest. Kui uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis Ca on kontrollrühma ussides > 0, tuleks seda arvestada kineetiliste parameetrite arvutamisel (vt 2. liide). Kõiki proove tuleks kogu katse vältel käsitleda nii, et minimeeritaks kaod ja saastumine (näiteks proovivõtuseadmele uuritava kemikaali adsorbeerumise tõttu).

50. Radiomärgistatud uuritava kemikaaliga töötamisel on võimalik analüüsida lähteainet ja metaboliite. Uuritava lähtekemikaali ja metaboliitide kvantitatiivne määramine statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus annab olulist teavet. Proove tuleks seejärel „puhastada”, et oleks võimalik määrata eraldi uuritava lähtekemikaali kogust. Kui mõne metaboliidi radioaktiivsus moodustab üle 10 % analüüsitud proovi(de) koguradioaktiivsusest, on soovitatav kõnealused metaboliidid tuvastada.

51. Uuritava kemikaali üldsaagis ning ussidest, mullast ja aurunud uuritava kemikaali püüdmiseks kasutatavatest absorbente sisaldavatest püüduritest (kui neid kasutatakse) määratud saagised tuleks registreerida ja esitada katseprotokollis.

52. Konkreetsest katsenõust võetud isendite proovide koondamine on lubatav vihmaussist väiksemate valgeliimuklaste puhul. Kui koondamine tähendab paralleelproovide arvu vähenemist, piirab see statistilisi meetodeid, millega on võimalik andmeid töödelda. Kui on vaja kasutada teatavat statistilist meetodit ja tagada andmete täpsus, tuleks proovide koondamist arvestades kasutada katses piisavat arvu paralleelproovidega katsenõusid selle tagamiseks.

53. On soovitatav, et bioakumulatsioonitegur oleks väljendatud nii summaarse kuivmassi funktsioonina kui ka vajaduse korral (näiteks väga hüdrofoobse kemikaali puhul) lipiidisisalduse funktsioonina. Lipiidisisalduse määramiseks tuleks kasutada asjakohaseid meetodeid (selleks tuleks kasutada mõnd olemasolevat meetodit, vt näiteks 31, 58). Nende meetodite puhul kasutatakse ekstraheerimist kloroformi/metanooliga. Klooritud lahustite kasutamise vältimiseks tuleks siiski kasutada Blighi ja Dyeri meetodi (9) muudetud versiooni (17). Kuna eri meetodid ei pruugi anda sama tulemust, on tähtis kirjeldada kasutatud meetodit. Kui see on võimalik, s.o kui usside kude on piisavalt, tuleks lipiidide analüüs teha ideaaljuhul sama proovi või ekstraktiga, mida kasutati uuritava kemikaali analüüsiks, kuna lipiidid tuleb ekstraktist sageli kõrvaldada, enne kui ekstrakti on võimalik kromatograafiliselt analüüsida (49). Alternatiivselt võib lipiidisisalduse mõõtmiseks kasutada kontrollrühma loomi; lipiidisisaldust on vaja teada bioakumulatsiooniteguri näitajate normeerimiseks. Viimasel juhul väheneb seadmete saastumine uuritava kemikaaliga.

▼M4

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

54. Uuritava kemikaali omastamise kõvera saamiseks kantakse aritmeetilises skaalas graafikule kemikaali kontsentratsioon ussides/ussidel omastamisfaasis sõltuvana ajast. Kui kõver on jõudnud platoole või statsionaarsesse olekusse (vt mõisted, 1. liide), arvutatakse statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur järgmise võrrandi alusel:

$$\frac{C_a \text{ stats. olekus või omastamisfaasi lõpus (keskmine)}}{C_s \text{ stats. olekus või omastamisfaasi lõpus (keskmine)}}$$

C_a on uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis;

C_s on uuritava kemikaali kontsentratsioon mullas.

55. Kui statsionaarse olekuni ei jõuta, tuleks statsionaarse oleku bioakumulatsiooniteguri asemel määrata kiiruskonstantidel põhinev kineetiline bioakumulatsioonitegur, nagu on kirjeldatud allpool:

— määratakse akumulatsioonitegur (BAF_K) suhtena k_s/k_e;

— omastamise ja kõrvaldamise kiirused arvutatakse eelistatavalt ühel ajal (vt 2. liide, võrrand 11);

— kõrvaldamise kiiruskonstant (k_e) määratakse tavaliselt kõrvaldamise kõvera alusel (s.o kõrvaldamisfaasis ussides leiduva uuritava aine kontsentratsiooni graafikust). Omastamise kiiruskonstant k_s arvutatakse seejärel k_e ja C_a väärtuse alusel, mis tuletatakse omastamise kõverast – nende meetodite kirjeldus on esitatud 2. liites. Kineetilise bioakumulatsiooniteguri ja kiiruskonstantide k_s ja k_e saamiseks eelistatud meetod on kasutada arvutis mittelineaarseid parameetri hindamise meetodeid. Kui kõrvaldamine ei ole ilmselgelt esimest järku, tuleks kasutada keerukamaid mudeleid.

Katseprotokoll

56. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav kemikaal:

— kogu kättesaadav teave, milles käsitletakse uuritava kemikaali ägedat ja pikaajalist mürgisust (näiteks EC_x, LC_x, täheldatava toimeta kontsentratsioon) mullas elavatele väheharjasussidele;

— puhtus, füüsikaline olek ja füüsikalis-keemilised omadused, näiteks log K_{ow}, lahustuvus vees;

— kemikaali tunnusandmed; uuritava aine päritolu, kasutatud lahusti nimetus ja kontsentratsioon;

— kui kasutatakse radiomärgistatud uuritavat kemikaali, siis märgistatud aatomite täpne asukoht, eriradioaktiivsus ja radiokeemiline puhtus.

Katseliik:

— teaduslik nimetus, liin, päritolu, kõik eeltöötlused, aklimatiseerumine, vanus, suuruse vahemik jms.

▼M4

Katsetingimused:

— kasutatud katsemeetod;

— kasutatud valgustuse tüüp ja omadused ning valgustuse kestus(ed);

— katse kava (näiteks katsenõude arv ja suurus, mulla mass ja mullakihi paksus, paralleelproovide arv, usside arv paralleelproovi kohta, katsekontsentratsioonide arv, omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi kestus, proovivõtu sagedus);

— katsenõu materjali valiku põhjendus;

— uuritava aine valmistamise ja kasutamise meetod ning samuti konkreetse meetodi valimise põhjused;

— nominaalsed katsekontsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed katsenõudes ning hälvete arvutamise meetod;

— tehismulla koostisosade päritolu või looduslike kasvukeskkondade kasutamisel mulla päritolu, eeltöötlemise kirjeldus, kontrollrühmade tulemused (elulemus, biomassi teke, paljunemine), mulla omadused (pH, orgaanilise süsiniku kogusisaldus, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsent), maksimaalne veemahutavus, veesisalduse protsent katse alguses ja lõpus ning kõik muud tehtud mõõtmised);

— üksikasjalik teave mulla- ja ussiproovide töötlemise kohta, sh andmed uuritava aine valmistamise, säilitamise, rikastamismeetodite, ussidest ja mullast ekstraheerimise ja analüüsimise meetodite (ning täpsuse) kohta ning lipiidisisalduse kohta (kui mõõdeti) ja uuritava aine analüüsisaagiste kohta.

Tulemused:

— kontrollrühma usside ja iga katsenõu usside suremus ning mis tahes täheldatud ebatavaline käitumine (näiteks mulla vältimine, mittepaljunemine valgeliimuklastega tehtavates bioakumulatsiooni katsetes);

— mulla ja katseorganismide kuivmassi ja märgmassi suhe (mis on vajalik normeerimise jaoks);

— usside märgmassid igal proovivõtuajal; vihmausside puhul märgmassid katse alguses ja igal proovivõtukorral enne ja pärast soolestiku tühjendamist;

— katseorganismide lipiidisisaldus (kui määrati);

— kõverad, mis näitavad uuritava kemikaali omastamise ja kõrvaldamise kineetikat ussides ja statsionaarse olekuni jõudmiseks vajalikku aega;

— C_a ja C_s (standardhälbe ja vahemikuga, kui see on asjakohane) kõigi proovivõtuaegade kohta (C_a väljendatud g-des kogu keha märg- ja kuivmassi kg^{-1} kohta, C_s väljendatud g-des mulla märg- ja kuivmassi kg^{-1} kohta). Kui on vaja leida elustiku-mulla akumulatsioonitegur (näiteks eri lipiidisisaldusega loomadega tehtud katsete tulemuste võrdlemiseks), võib C_a olla väljendatud ka g-des organismi lipiidisisalduse kg^{-1} kohta ja C_s võib olla väljendatud g-des mulla orgaanilise süsiniku kg^{-1} kohta;

— samuti võib esitada järgmised näitajad: bioakumulatsioonitegur (väljendatuna mulla kg alusel ussi kg^{-1} kohta), mullast omastamise kiiruskonstant k_s (väljendatuna mulla g alusel usside kg^{-1} ja $päeva^{-1}$ kohta) ning kõrvaldamise kiiruskonstant k_e (väljendatuna $päeva^{-1}$ kohta); elustiku-mulla akumulatsioonitegur (väljendatuna mulla kg-des orgaanilise süsiniku kg^{-1} kohta ja ussi lipiidisisalduse alusel);

▼M4

— kui neid mõõdetakse, siis lähtekemikaali protsendid, metaboliidid ja seotud jäägid (s.o uuritava kemikaali protsent, mida ei saa tavapäraste ekstraheerimismeetodite abil ekstraheerida), mis on tuvastatud mullas ja katseloomades;

— andmete statistiliste analüüside jaoks kasutatud meetodid.

Tulemuste hindamine:

— tulemuste vastavus kehtivuskriteeriumidele, mis on loetletud punktis 17;

— ootamatud või ebatavalised tulemused, näiteks uuritava kemikaali mittetäielik kõrvaldamine katseloomadest.

KIRJANDUS

1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus.* ASTM International, E1676-04: 26 pp.

4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.

6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.

7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.

8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.

9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.

10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.

13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼M4

14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91–100.

15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2–29.

16) Didden WAM (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555–576.

17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140–145.

19) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1907/2006, 18. detsember 2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93, komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ (ELT L 396, 30.12.2006, lk 1).

20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

21) OECD (2008). Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Allalaaditav aadressil http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.

26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897–1905.

27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501–1514.

28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.

30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.

31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.

32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.

34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

35) ISO 11268-2 (1998). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

36) Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.

37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.

38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.

39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.

40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.

41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.

43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.

45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.

46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼**M4**

47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

48) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele".

49) Käesoleva lisa peatükk C.13 „Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse".

50) Käesoleva lisa peatükk C.21 „Mullamikroobid: lämmastiku transformatsiooni katse".

51) OECD (2004a). Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

52) OECD (2004b). Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

53) OECD (2008). Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.

56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.

57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.-Toxicol. Chem. 10: 1431–1436.

59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.

62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107–127.

63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110–2120.

64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413–433.

65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.

70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023–1033.

76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409–417.

77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161–165.

78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843–1851.

79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

1. liide

MÕISTED

Bioakumulatsioon – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismil, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas. Bioakumulatsioon on biokontsentratsiooni ja biomagnifikatsiooni (vt allpool) tulemus.

Biokontsentratsioon – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismil ainult ümbritsevast kasvukeskkonnast kemikaali omastamise teel (näiteks keha pinna ja allaneelatud mulla kaudu), võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas.

Biomagnifikatsioon – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismil peamiselt saastunud toidu või saagi kaudu omastamise teel, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga toidus või saagis. Biomagnifikatsioon võib viia uuritava aine ülekandumise või kogunemiseni toiduvõrgustikes.

Uuritava kemikaali **kõrvaldamine** – kemikaali kadumine katseorganismi kudedest aktiivsete või passiivsete protsesside tõttu, mis tekivad, sõltumata uuritava aine olemasolust või selle puudumisest ümbritsevas kasvukeskkonnas.

Bioakumulatsioonitegur (BAF) – uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismil (C_a, g-des ussi kuivmassi kg kohta) kõnealuse bioakumulatsiooni katse omastamisfaasis igal ajamomendil jagatuna kemikaali kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas (C_s, g-des mulla kuivmassi kg kohta); bioakumulatsiooniteguri ühikud on mulla kg ussi kg kohta.

Statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur (BAF_{ss}) – bioakumulatsioonitegur statsionaarse oleku puhul, see ei muutu oluliselt pika ajavahemiku jooksul; uuritava kemikaali kontsentratsioon ümbritsevas kasvukeskkonnas (C_s, g-des mulla kuivmassi kg kohta) jääb selle ajavahemiku vältel püsivaks.

Bioakumulatsioonitegurid, mis arvutatakse otse mullast omastamise kiiruskonstandist ja kõrvaldamise kiiruskonstandist (k_s ja k_e, vt allpool), on kineetilised bioakumulatsioonitegurid (BAF_K).

Elustiku-mulla akumulatsioonitegur (BSAF) – lipiidide suhtes normeeritud uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismil, jagatuna uuritava kemikaali orgaanilise süsiniku suhtes normeeritud kontsentratsiooniga mullas statsionaarses olekus. C_a on sel juhul väljendatud g-des organismi lipiidide kg kohta ja C_s g-des mulla orgaanilise aine kg kohta; elustiku-mulla akumulatsiooniteguri ühikud on kg orgaanilist süsinikku lipiidi kg kohta.

Platoo või **statsionaarne olek** – määratletud kui tasakaaluolek omastamise ja kõrvaldamise protsesside vahel, mis toimuvad kokkupuutefaasis ühel ja samal ajal. Statsionaarne olek saavutatakse bioakumulatsiooniteguri ajast sõltuvuse graafikul, kui kõver muutub ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevase vahemikuga võetud proovide bioakumulatsiooniteguri kolm järjestikust analüüsi jäävad üksteisest 20 % piiresse ning kolme proovivõtu ajavahemiku vahel ei ole statistiliselt olulisi erinevusi. Uuritavate kemikaalide puhul, mida omastatakse aeglasemalt, oleksid sobivamad seitsmepäevased ajavahemikud (49).

Orgaanilise süsiniku-vee jaotuskoefitsient (K_{oc}) – kemikaali kontsentratsiooni suhe mulla orgaanilise süsiniku fraktsioonis/fraktsioonil ja kemikaali kontsentratsioon vees tasakaaluoleku puhul.

Oktanooli-vee jaotuskoefitsient (K_{ow}) – kemikaali lahustuvuse suhe n-oktanoolis ja vees tasakaaluolekus, mida vahel tähistatakse ka P_{ow}-ga. K_{ow} logaritmi (log K_{ow}) kasutatakse kui kemikaali võimaliku veeorganismidesse kogunemise (bioakumulatsiooni) üht näitajat.

▼M4

Omastamis- või kokkupuutefaas – aeg, mille vältel katseorganismid puutuvad kokku uuritava kemikaaliga.

Mullast omastamise kiiruskonstant (k_s) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni suurenemise kiirus katseorganismil/katseorganismis, mille on põhjustanud omastamine mullafaasist; k_s mõõdetakse mulla g-des usside kg ja päeva kohta.

Kõrvaldamisfaas – aeg, mis järgneb katseorganismide ülekandmisele uuritava ainega rikastatud kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda, mille vältel uuritakse kemikaali kõrvaldamist katseorganismidest (või netokadu).

Kõrvaldamise kiiruskonstant (k_e) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni vähenemise kiirus katseorganismil/katseorganismis pärast katseorganismide ülekandmist uuritavat ainet sisaldavast kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda; k_e ühik on d^{-1}.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4

2. liide

Omastamise ja kõrvaldamise parameetrite arvutamine

Bioakumulatsiooni katse peamine näitaja on bioakumulatsioonitegur, BAF. Bioakumulatsioonitegurit on võimalik mõõtmistulemustest arvutada, kui statsionaarse oleku kontsentratsioon katseorganismis (C_a) jagatakse kontsentratsiooniga mullas (C_s). Kui omastamisfaasi ajal statsionaarse olekuni ei jõuta, siis arvutatakse kiiruskonstantidest statsionaarse oleku bioakumulatsiooniteguri asemel kineetiline bioakumulatsioonitegur. Siiski tuleks ära märkida, kas bioakumulatsioonitegur põhineb statsionaarse oleku kontsentratsioonidel või mitte.

Tavapärane meetod kineetilise bioakumulatsiooniteguri (BAF_K), mullast omastamise kiiruskonstandi (k_s) ja kõrvaldamise kiiruskonstandi (k_e) leidmiseks on kasutada arvutitöötluses mittelineaarseid parameetri hindamise meetodeid, näiteks väljaandes 68 kirjeldatud mudelite alusel. Järjestikuste kontsentratsiooni ajast sõltuvuse andmete komplekti ja mudeli võrrandite puhul

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[võrrand 1]}$$

või

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[võrrand 2],}$$

kus

C_a = kemikaali kontsentratsioon ussides (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

k_s = omastamise kiiruskonstant koes (mulla g ussi kg^{-1} d^{-1})

C_s = kemikaali kontsentratsioon mullas (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

k_e = kõrvaldamise kiiruskonstant (d^{-1})

t_c = aeg omastamisfaasi lõpus,

saab nende arvutiprogrammidega arvutada BAF_K, k_s ja k_e väärtused.

Kui kontrollkatse (kemikaaliga mitte kokkupuutuvate) usside taustkontsentratsioon, näiteks päeval 0, erineb märkimisväärselt nullist (see võib nii olla näiteks metallide puhul), tuleks kõnealune taustkontsentratsioon ($C_{a,0}$) lisada võrranditesse, muutes neid järgmiselt:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[võrrand 3]}$$

ja

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[võrrand 4]}$$

Kui täheldatakse uuritava kemikaali kontsentratsiooni märkimisväärset vähenemist mullas omastamisfaasi vältel, võib kasutada järgmisi mudeleid (67, 79):

$$C_s = C_0(e^{-k\ 0^{t}}) \qquad \text{[võrrand 5],}$$

▼M4

kus

C_s = kemikaali kontsentratsioon mullas (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

k_0 = lagunemise kiiruskonstant mullas (d^{-1})

C_0 = kemikaali esialgne kontsentratsioon mullas (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[võrrand 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[võrrand 7],}$$

kus

C_a = kemikaali kontsentratsioon ussides (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

k_s = omastamise kiiruskonstant koes (mulla g ussi kg^{-1} d^{-1})

k_0 = lagunemise kiiruskonstant mullas (d^{-1})

k_e = kõrvaldamise kiiruskonstant (d^{-1})

t_c = aeg omastamisfaasi lõpus.

Kui statsionaarse olekuni jõutakse omastamisfaasi vältel (s.o $t = \infty$), siis võib võrrandi 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[võrrand 1]}$$

taandada kujule:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

või

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[võrrand 8]}$$

Sel juhul on $k_s/k_e \times C_s$ lähenemine uuritava aine kontsentratsioonile ussi kudedes statsionaarses olekus ($C_{a,ss}$).

Elustiku-mulla akumulatsioonitegurit (BSAF) saab arvutada järgmiselt:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[võrrand 9],}$$

kus f_{oc} on mulla orgaanilise süsiniku fraktsioon ja f_{lip} on ussi lipiidifraktsioon, mis on mõlemad eelistatavalt määratud katse ajal võetud proovidest ja põhinevad vastavalt kas kuivmassil või märgmassil.

Kõrvaldamise kineetikat on võimalik modelleerida, kasutades kõrvaldamisfaasi andmeid ja kohaldades järgmist mudelvõrrandit ning arvutipõhist mittelineaarset parameetri hindamise meetodit. Kui aja järgi graafikule kantud andmepunktid näitavad pidevat eksponentsiaalset uuritava aine kontsentratsiooni vähenemist loomades, siis võib ajast sõltuva kõrvaldamise kirjeldamiseks kasutada ühekambri-mudelit (võrrand 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[võrrand 10]}$$

▼**M4**

Kõrvaldamisprotsessid näivad vahel olevat kahefaasilised, näidates C_a kiiret vähenemist kõrvaldamisfaasi alguses, mis hiljem muutub uuritava aine aeglasemaks kaoks kõrvaldamise hilisemates järkudes, vt näiteks 27, 68. Kahte faasi on võimalik tõlgendada eeldusega, et organismis on kaks eraldi kambrit, millest uuritav aine kaob erineva kiirusega. Neil juhtudel tuleks vaadata asjakohaseid väljaandeid, näiteks 38, 39, 40, 78.

Eespool esitatud mudelvõrrandite abil võib kineetilised parameetrid (k_s ja k_e) arvutada ka korraga, kohaldades esimese järgu kineetika mudelit korraga kõigile omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi andmetele. Omastamise ja kõrvaldamise kiiruskonstantide sellise kombineeritud arvutamise meetodi kirjeldus on esitatud väljaannetes 40, 72 ja 69.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[võrrand 11]}$$

Märkus. Kui omastamise ja kõrvaldamise parameetreid hinnatakse korraga omastamise ja kõrvaldamise ühendatud andmetest, võimaldab võrrandis 11 kasutatud näitaja m arvutiprogrammil seostada võrrandi alamliikmeid vastava faasi andmekomplektidega ja võrrandit õigesti rakendada (m = 1 omastamisfaasi korral; m = 2 kõrvaldamisfaasi korral).

Sellest hoolimata tuleks mudelvõrrandeid kasutades olla ettevaatlik, eelkõige kui katse ajal võib muutuda uuritava kemikaali biosaadavus või esineb kemikaali (bio)lagunemine (vt näiteks 79).

▼**M4**

3. liide

MULLA BIOAKUMULATSIOONI KATSETE AJAVAKAVADE NÄITED

Katse vihmaussidega

a) Omastamisfaas kineetika arvutamiseks kasutatava kaheksa proovivõtu kuupäevaga

Päev	Tegevus
–6	Ettevalmistatud mulla kohandamine 48 tunni vältel.
–4	Mulla fraktsiooni rikastamine uuritava kemikaali lahusega; lahusti aurustamine; mulla koostisosade segamine; mulla jaotamine katsenõudesse; katsetingimustel tasakaalustamine nelja päeva vältel (kolme nädala vältel metalliga rikastatud mulla korral).
–3 kuni –1	Katseorganismide eraldamine kultuurist aklimatiseerumiseks; mulla koostisosade ettevalmistamine ja niisutamine.
0	Temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mullaproovide võtmine töödeldud nõudest ja lahusti kontrollkatse nõudest uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; söödaratsiooni lisamine; usside kaalumine ja randomiseeritud jaotamine katsenõudesse; usside piisavate allproovide säilitamine analüütiliste taustnäitajate, märg- ja kuivmassi ning lipiidisisalduse määramiseks; kõigi katsenõude kaalumine mulla niiskuse kontrollimiseks; õhuvarustuse kontrollimine, kui kasutatakse suletud katsesüsteemi.
1	Õhuvarustuse kontrollimine, usside käitumise ja temperatuuri registreerimine; mulla- ja usside proovide võtmine uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks.
2	Sama kui päeval 1.
3	Õhuvarustuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
4	Sama kui päeval 1.
5–6	Sama kui päeval 3.
7	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
8–9	Sama kui päeval 3.
10	Sama kui päeval 1.
11–13	Sama kui päeval 3.
14	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
15–16	Sama kui päeval 3.
17	Sama kui päeval 1.
18–20	Sama kui päeval 3.

▼**M4**

Päev	Tegevus
21	Sama kui päeval 1; temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel; omastamisfaasi lõpp; usside ülekandmine allesolevatest kokkupuute paralleelproovidest kõrvaldamisfaasi jaoks puhast mulda sisaldavatesse nõudesse (ilma soolestiku tühjendamiseta); mulla- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollrühmades.
	Kokkupuute-eelsed tegevused (tasakaalustamise faas) tuleks ajakavas määrata uuritava kemikaali omadusi arvesse võttes.
	Päeva 3 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

b) Kõrvaldamisfaas

Päev	Tegevus
–6	Mulla koostisosade ettevalmistamine ja niisutamine; ettevalmistatud mulla kohandamine 48 tunni vältel.
–4	Mulla koostisosade segamine; mulla jaotamine katsenõudesse; inkubeerimine katsetingimustes neli päeva.
0 (omastamisfaasi lõpp)	Temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; usside kaalumine ja randomiseeritud jaotamine katsenõudesse; söödaratsiooni lisamine; usside ülekandmine allesolevatest kokkupuute paralleelproovidest puhast mulda sisaldavatesse nõudesse; mulla- ja usside proovide võtmine 4–6 tunni pärast uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
1	Õhuvarustuse kontrollimine, usside käitumise ja temperatuuri registreerimine; mulla- ja usside proovide võtmine uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
2	Sama kui päeval 1.
3	Õhuvarustuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
4	Sama kui päeval 1.
5–6	Sama kui päeval 3.
7	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
8–9	Sama kui päeval 3.
10	Sama kui päeval 1.
11–13	Sama kui päeval 3.
14	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
15–16	Sama kui päeval 3.
17	Sama kui päeval 1.

▼M4

Päev	Tegevus
18–20	Sama kui päeval 3.
21	Sama kui päeval 1; temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel; mulla- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollrühmadest.
	Mulla ettevalmistamine enne kõrvaldamisfaasi tuleks teha samal viisil kui enne omastamisfaasi.
	Päeva 3 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

Katse valgeliimuklastega

a) Omastamisfaas kineetika arvutamiseks kasutatava kaheksa proovivõtu kuupäevaga

Päev	Tegevus
–6	Ettevalmistatud mulla kohandamine 48 tunni vältel.
–4	Mulla fraktsiooni rikastamine uuritava kemikaali lahusega; lahusti aurustamine; mulla koostisosade segamine; mulla jaotamine katsenõudesse; katsetingimustel tasakaalustamine nelja päeva vältel (kolme nädala vältel metalliga rikastatud mulla korral).
–3 kuni –1	Katseorganismide eraldamine kultuurist aklimatiseerumiseks; mulla koostisosade ettevalmistamine ja niisutamine.
0	Temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mullaproovide võtmine töödeldud nõudest ja lahusti kontrollkatse nõudest uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; söödaratsiooni lisamine mulda; usside kaalumine ja randomiseeritud jaotamine katsenõudesse; usside piisavate allproovide säilitamine analüütiliste taustnäitajate, märg- ja kuivmassi ning lipiidisisalduse määramiseks; kõigi katsenõude kaalumine mulla niiskuse kontrollimiseks; õhuvarustuse kontrollimine, kui kasutatakse suletud katsesüsteemi.
1	Õhuvarustuse kontrollimine, usside käitumise ja temperatuuri registreerimine; mulla- ja usside proovide võtmine uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks.
2	Sama kui päeval 1.
3	Õhuvarustuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
4	Sama kui päeval 1.
5–6	Sama kui päeval 3.
7	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine mulda; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
9	Sama kui päeval 1.
10	Sama kui päeval 3.

▼**M4**

Päev	Tegevus
11	Sama kui päeval 1.
12–13	Sama kui päeval 3.
14	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine mulda; temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel; omastamisfaasi lõpp; usside ülekandmine allesolevatest kemikaaliga kokkupuute paralleelproovidest kõrvaldamisfaasi jaoks puhast mulda sisaldavatesse nõudesse (ilma soolestiku tühjendamiseta); mulla- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollkatse rühmades.
	Kokkupuute-eelsed tegevused (tasakaalustamise faas) tuleks ajakavas määrata kemikaali omadusi arvesse võttes.
	Päeva 3 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

▼M4

4. liide

Tehismuld – soovitused valmistamise ja säilitamise kohta

Kuna konkreetsest allikast looduslik muld ei pruugi olla kogu aasta vältel kättesaadav ja katset võivad mõjutada seal elavad organismid ning samuti mikrosaasteained, on soovitatav kasutada katses tehislikku substraati, tehismulda, vastavalt käesoleva lisa peatükile C.8 „Toksilisus vihmaussidele”(48). Selles mullas saavad ellu jääda, kasvada ja paljuneda mitmed katseliigid ning tagatakse katse- ja kultuuritingimuste maksimaalne standardiseeritus ning samuti laborisisene ja laboritevaheline võrreldavus.

Mulla koostisosad

Turvas:	10 %	Turbasammal kooskõlas OECD suunisega 207 (48).
Kvartsliiv:	70 %	Tööstuslik kvartsliiv (õhu käes kuivatatud); tera suurus: rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm, kuid kõik osakesed peaksid olema ≤ 2 mm.
Kaoliinsavi:	20 %	Kaoliniidisisaldus ≥ 30 %.
Kaltsiumkarbonaat:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas.

Soovi korral võib tehismulla orgaanilise süsiniku sisaldust vähendada, vähendades näiteks turbasisaldust 4–5 %-le kuivast mullast ja suurendades vastavalt liivasisaldust. Sellise orgaanilise süsiniku sisalduse vähendamise teel võib uuritava kemikaali mullal adsorbeerumise (orgaaniline süsinik) võimalus väheneda ja uuritava kemikaali saadavus ussidele võib suureneda (74). On tõendatud, et *Enchytraeus albidus* ja *Eisenia fetida* suudavad täita paljunemist käsitleva kehtivuskriteeriumi, kui neid katsetatakse põllumullas, millel on väiksem orgaanilise süsiniku sisaldus, näiteks 2,7 % (33, 61), ja seniste kogemuste põhjal on seda võimalik saavutada 5 % turbasisaldusega tehismullas.

Valmistamine

Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (näiteks suuremahulises laborisegistis). Seda tuleks teha enne katse alustamist ligikaudu nädala jooksul. Segatud kuiva mulla koostisosi tuleks niisutada deioniseeritud veega vähemalt 48 tundi enne uuritava aine lisamist, et tasakaalustada/stabiliseerida happesust. pH määramiseks kasutatakse mulla ja 1 M KCl lahust suhtega 1 : 5. Kui pH ei ole nõutud vahemikus (6,0 ± 0,5), lisatakse mullale piisavas koguses $CaCO_3$ või valmistatakse ette uus mullapartii.

Tehismulla maksimaalne veemahutavus määratakse kooskõlas standardiga ISO 11268-2 (35). Kuiva tehismulda niisutatakse vähemalt kaks päeva enne katse alustamist, lisades piisavalt deioniseeritud või taastatud vett, et saada ligikaudu pool lõplikust veesisaldusest. Lõplik veesisaldus peaks olema 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest. Katse alguses jagatakse eelnevalt niisutatud muld nii mitmeks partiiks, kui on katse vältel kasutatud katsekontsentratsioone ja kontrollrühmi, ning niiskusesisaldus reguleeritakse 40–60 %-le maksimaalsest veemahutavusest, kasutades uuritava aine lahust ja/või lisades deioniseeritud või taastatud vett. Niiskusesisaldus määratakse katse alguses ja lõpus (105 °C juures). See peaks olema optimaalne liikide vajaduste jaoks (niiskusesisaldust võib samuti kontrollida järgmiselt: kui mulda käes kergelt vajutatakse, siis peaksid sõrmede vahele tekkima väiksed veepiisad).

▼**M4**

Säilitamine

Tehismulla kuivi koostisosi võib toatemperatuuril säilitada kuni kasutamiseni. Valmistatud eelnevalt niisutatud mulda võib säilitada jahedas kohas kuni kolm päeva enne rikastamist; tuleks olla hoolikas, et vältida vee aurumist. Uuritava ainega rikastatud mulda tuleks kasutada viivitamata, v.a juhul, kui on andmeid selle kohta, et konkreetset mulda saab säilitada ilma uuritava aine mürgisust ja biosaadavust mõjutamata. Rikastatud mulla proove võidakse seejärel säilitada kuni analüüsini konkreetse uuritava aine jaoks soovitatavates tingimustes.

▼M4

5. liide

Mulla väheharjasusside liigid, keda soovitatakse kasutada mullast toimuva bioakumulatsiooni katsete tegemiseks

Vihmaussid

Soovitatav katseliik on *Eisenia fetida* (Savigny 1826), kes kuulub *Lumbricidae* sugukonda. Alates 1972. aastast on see jaotatud kahte alamliiki (*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* (10)). Jaenike (36) kohaselt on need täiesti eraldi liigid. *Eisenia fetida* on kergesti äratuntav oma heledate segmentidevaheliste kollaste triipude poolest, aga *Eisenia andrei* värvus on ühtlaselt tumepunane. Need liigid on tõenäoliselt pärit Musta mere piirkonnast ja neid esineb praegu kõikjal maailmas eelkõige inimeste tekitatud elupaikades, nagu kompostihunnikud. Mõlemat liiki saab kasutada ökotoksikoloogilisteks ja bioakumulatsiooni katseteks.

Eisenia fetida ja *Eisenia andrei* on kaubanduslikult saadaval näiteks kalasöödana. Võrreldes muude *Lumbricidae* sugukonda kuuluvate vihmaussidega on neil lühike elutsükkel ja nad saavad (toatemperatuuril) täiskasvanuks ligikaudu kahe kuni kolme kuu vanusena. Nende optimaalne temperatuur on ligikaudu 20–24 °C. Nad eelistavad suhteliselt niiskeid substraate, mille pH on peaaegu neutraalne ja orgaanilise materjali sisaldus on suur. Kuna neid liike on standarditud ökotoksikoloogilistes katsetes ligikaudu 25 aasta vältel laialdaselt kasutatud, on nende kultuuris kasvatamine hästi dokumenteeritud (48, 77).

Mõlemat liiki saab kasvatada mitmesugustes loomsetes jäätmetes. ISO (35) alusel soovitatud kasvatamise keskkond on hobuse- või veisesõnniku ja turba segu 50 : 50. Kasvukeskkonna pH peaks olema ligikaudu 6–7 (reguleeritakse kaltsiumkarbonaadiga), kasvukeskkonnal peaks olema vähene ioonjuhtivus (vähem kui 6 mS/cm või vähem kui 0,5 % soola kontsentratsioon) ja see ei tohiks olla ammoniaagi või loomauriiniga liigselt saastunud. Samuti võib kasutada müügil olevat aiamulda, mis ei sisalda lisandeid, või tehismulda OECD (48) kohaselt või nende mõlema segu 50 : 50. Substraat peaks olema niiske, kuid mitte liiga märg. Sobivad on 10- kuni 50-liitrised kasvatuskastid.

Standardse vanuse ja massiga usside saamiseks on parim alustada kultuuri kookonitega. Seepärast lisatakse värsket substraati sisaldavasse kasvatuskasti täiskasvanud ussid kookonite saamiseks. Praktilised kogemused on näidanud, et populatsiooni tihedus ligikaudu 100 täiskasvanud ussi substraadi (märgmassi) kg kohta annab head paljunemismäärad. Pärast 28 päeva möödumist täiskasvanud ussid eemaldatakse. Kookonitest koorunud vihmausse kasutatakse katsetamiseks vähemalt 2 kuu ja mitte kauem kui 12 kuu möödumisel täiskasvanuks saamisest.

Eespool kirjeldatud liiki usse saab pidada terveks, kui nad liiguvad kogu substraadis, ei proovi substraadist lahkuda ja paljunevad pidevalt. Väga aeglane liikumine või kollane tagaosa (*Eisenia fetida* puhul) viitab substraadi kurnatusele. Sel juhul soovitatakse kasutada värsket substraati ja/või väiksemat arvu loomi kasti kohta.

Täiendavad valitud viited

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1–58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1–81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331–338 pp.

Valgeliimuklased

Soovitatav katseliik on *Enchytraeus albidus,* Henle 1837 (valgeliimukas). *Enchytraeus albidus* on üks suurimaid (kuni 15 mm) rõngusside hõimkonna väheharjasusside klassi *Enchytraeidae* sugukonna liike ja seda leidub kogu maailmas, vt näiteks 8. *Enchytraeus albidus*'t leidub merelistes, siseveekogude ja mullastiku elupaikades peamiselt lagunevas orgaanilises aines (vetikad, kompost) ja harvadel juhtudel niitudel (42). Kõnealune lai ökoloogiline taluvus ja mõni morfoloogiline erinevus näitab, et kõnealusel liigil võib olla erinevaid liigisiseseid rühmi.

Enchytraeus albidus on kaubanduslikult saadaval, seda müüakse kalasöödana. Tuleks kontrollida, kas kultuur on saastunud muude, enamasti väiksemate liikidega (60). Kui saastumine on toimunud, siis tuleks kõiki usse pesta veega Petri tassis. Seejärel valitakse (stereomikroskoobi abil) uue kultuuri alustamiseks *Enchytraeus albiduse* suured isendid. Kõik muud ussid visatakse ära. Liigi elutsükkel on lühike ja täiskasvanuks saadakse 33 päevaga (18 °C juures) kuni 74 päevaga (12 °C juures). Katses tuleks kasutada ainult kultuure, mida on ilma probleemideta laboris hoitud vähemalt viis nädalat (üks põlvkond).

Muud *Enchytraeus*'e perekonna liigid on samuti sobivad, eelkõige *Enchytraeus luxuriosus*. See liik elab tegelikult mullas ja seda on hiljuti kirjeldatud väljaandes (65). Kui kasutatakse muud *Enchytraeus*'e perekonna liiki, tuleks see selgelt tuvastada ja liigi valimist tuleks põhjendada.

Enchytraeus crypticus (Westheide ja Graefe 1992) on liik, mis kuulub samasse rühma kui *Enchytraeus luxuriosus*. Selle leidumist looduses ei ole veel kindlalt tuvastatud, seda on ainult kirjeldatud vihmausside kultuurides ja kompostihunnikutes (Römbke 2003). Selle algsed ökoloogilised nõuded ei ole seega teada. Hiljutised laboriuuringud erinevate alade muldadega on kinnitanud, et sellel liigil on laialdane taluvus mulla omaduste (nagu pH ja tekstuur) suhtes (Jänsch *et al.* 2005). Viimastel aastatel on seda liiki sageli kasutatud ökotoksikoloogilistes uuringutes, kuna seda on lihtne kasvatada ja katsetada, näiteks Kuperman *et al.* 2003. Isendid on siiski väiksed (3–12 mm; keskmiselt 7 mm) (Westheide & Müller 1996), mis muudab käsitlemise *Enchytraeus albidus*'ega võrreldes keerukamaks. Selle liigi kasutamisel *Enchytraeus albidus*'e asemel võib katsenõu olla väiksem, aga ei pruugi seda olla. Lisaks sellele tuleks arvesse võtta, et see liik paljuneb väga kiiresti. Selle põlvkond saab 20 ± 2 °C juures küpseks vähem kui 20 päevaga (Achazi *et al.* 1999) ja kõrgemal temperatuuril isegi kiiremini.

Enchytraeidae sugukonda kuuluvad *Enchytraeus albidus*'e liigi isendeid (ning samuti muude *Enchytraeus*'e perekonna liikide isendeid) on võimalik kasvatada suurtes plastkastides (näiteks 30 × 60 × 10 cm või 20 × 12 × 8 cm, mis on sobivad väikeste usside kasvukultuuri jaoks), mis on täidetud tehismulla ja müügil oleva ilma lisanditeta saastumata aiamulla seguga. Kompostmaterjali tuleks vältida, kuna see võib sisaldada mürgiseid kemikaale, nagu raskmetalle. Fauna tuleks kasvumullast enne kasutamist kolmekordse sügavkülmutamise teel eemaldada. Võib kasutada ka puhast tehismulda, aga paljunemiskiirus selles võib segatud substraatidega võrreldes olla väiksem. Substraadi pH peaks olema 6,0 ± 0,5. Kultuuri hoitakse ilma valguseta inkubaatoris temperatuuril 15 ± 2 °C. Igal juhul tuleks vältida kõrgema temperatuuri kui 23 °C kasutamist. Tehismuld / looduslik muld peaks olema niiske, aga mitte märg. Kui mulda käega õrnalt vajutatakse, peaksid ilmuma ainult väiksed veepiisad. Igal juhul tuleks vältida hapnikuvaegust (näiteks kaane kasutamisel peaks kaane aukude arv olema piisavalt suur, et tagada piisav õhuvahetus). Kasvumulda tuleks kord nädalas hoolika segamisega aereerida.

▼M4

Usse tuleks vähemalt korra nädalas valitud ajal sööta valtsitud kaeraga, mis asetatakse mulda tehtud auku ja kaetakse mullaga. Kui mahutisse jääb eelmisest söötmise kuupäevast sööta, tuleks antava sööda kogust sellele vastavalt kohandada. Kui allesolevale söödale kasvavad seened, tuleks see asendada valtsitud kaera uue kogusega. Paljunemise stimuleerimiseks võib valtsitud kaera täiendada iga kahe nädala tagant müügil oleva vitamiinidega täiendatud valgupulbriga. Kolme kuu möödumisel kantakse loomad üle värskelt valmistatud kultuuri või kasvusubstraati. Valtsitud kaer, mida tuleb säilitada suletud nõudes, tuleks enne kasutamist aidalestade (näiteks *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) või röövlestadega (näiteks *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*) saastumise vältimiseks autoklaavida või läbi kuumutada. Pärast desinfitseerimist jahvatatakse sööt nii, et seda oleks lihtne mulla pinnale puistata. Muud võimalikud söödaallikad on pagaripärm või kalasööt TetraMin®.

Üldjoontes on kasvukultuuri tingimused piisavalt head, kui ussid ei proovi substraadist lahkuda, liiguvad mullas kiiresti, nende välispind on läikiv ilma selle külge jäänud mullaosakesteta, ussid on üldjoontes valkja värvusega ja kui näha on erinevas vanuses usse. Tegelikult saab usse pidada terveks, kui nad pidevalt paljunevad.

Täiendavad valitud viited

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.

▼M6

C.31. KATSE MAISMAATAIMEDEGA: TÄRKAMINE JA SEEMIKU KASV

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 208 (2006). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut ja kaaluda nende kasutatavust regulatiivsete vajaduste rahuldamiseks. Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi abil hinnatakse kemikaalide võimalikku mõju seemikute tärkamisele ja kasvule. Meetod ei hõlma kroonilist mõju ega mõju paljunemisvõimele (st seemnete valmimisele, õitsemisele, viljade küpsemisele). Et tagada sobiva katsemeetodi kasutamine, tuleb arvesse võtta uuritava kemikaali omadusi ja kokkupuutetingimusi (näiteks tuleks metallide/metalliühendite puhul arvesse võtta nendega seotud vastasioonide ja pH mõju) (1). Käesolev katsemeetod ei hõlma taimede kokkupuudet kemikaaliaurudega. Meetod on kasutatav üldotstarbeliste kemikaalide, biotsiidide ja taimekaitsevahendite (pestitsiidide) mõju hindamiseks. See on välja töötatud olemasolevate meetodite põhjal (2, 3, 4, 5, 6, 7). Samuti võeti arvesse taimedega tehtavaid katseid käsitlevaid muid allikaid (8, 9, 10). Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

2. Katsega hinnatakse kõrgemate taimede seemikute tärkamisele ja varajasele kasvule avalduvat mõju kokkupuutel mullas (või muus sobiva koostisega pinnases) esineva uuritava kemikaaliga. Seemned viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga töödeldud pinnasega ja neile avalduvat mõju hinnatakse tavaliselt 14–21 päeva jooksul pärast 50 % seemikute tärkamist kontrollrühmas. Katses mõõdetavad näitajad on silmaga hinnatav tärkamine, võrsete kuivmass (või märgmass) ja teatud juhtudel võrsete kõrgus, samuti silmaga hinnatav kahjulik mõju taime eri osadele. Neid mõõtmistulemusi ja vaatlusi võrreldakse kemikaaliga mitte kokku puutunud kontrolltaimede vastavate näitajatega.

3. Olenevalt eeldatavast kokkupuuteviisist viiakse uuritav kemikaal mulda (või kunstlikku pinnasesse) või töödeldakse sellega mullapinda, vastavalt sellele, kumb kemikaaliga kokkupuutumise viis peegeldab võimalikku tegelikku olukorda. Mulda viimise korral töödeldakse kogu mulda korraga. Pärast töötlemist jaotatakse muld pottidesse ja seejärel pannakse asjaomase taimeliigi seemned mulda. Kui kemikaaliga töödeldakse mullapinda, tehakse seda pottides oleva mullaga pärast seemnete muldapanekut. Seejärel tagatakse katseüksustele (kontrollid ja töödeldud muld koos seemnetega) sobivad tingimused seemnete idanemise ja taimede kasvu võimaldamiseks.

4. Katse eesmärgist sõltuvalt võib selle läbi viia koguse ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera saamiseks või piirsisalduskatsena, milles kasutatakse ühte kindlat kontsentratsiooni või koguselist määra. Kui ühel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhineva katse tulemustest nähtub, et mürgisus ületab teatud taseme (nt täheldatakse suuremat mõju kui x %), tehakse mürgisuse ülem- ja alampiiri määramiseks kogusevahemiku leidmise katse ja seejärel mitmel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse koguse ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera koostamiseks. Sobiva statistilise analüüsimeetodiga leitakse kõige tundlikuma(te) vaadeldava(te) näitaja(te) alusel efektiivne kontsentratsioon EC_x või efektiivne kogus ER_x (nt EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}). Kõnealuse katsega saab kindlaks teha ka täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) ja vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC).

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

5. Kemikaaliga kokkupuutumise eeldatava viisi kindlakstegemisel ja katseplaani koostamisel on kasu järgmisest teabest: struktuurivalem, puhtus, lahustuvus

▼M6

vees, lahustuvus orgaanilistes lahustites, jaotuskoefitsient süsteemis 1-oktanool/vesi, aururõhk, sorbeeruvus pinnases, keemiline püsivus vees ja valguse käes ning biolagunduvus.

KATSE NÕUETEKOHASUS

6. Katse loetakse nõuetekohaseks, kui kontrollrühmas on täidetud järgmised kriteeriumid:

— seemikute tärkamine on vähemalt 70 %;

— seemikutel ei täheldata nähtavaid fütotoksilisuse ilminguid (nt kloroos, nekroos, närbumine, varre või lehtede moondumine) ning varieeruvus taimede kasvus ja morfoloogias jääb konkreetsele liigile iseloomulikku vahemikku;

— tärganud seemikute keskmine ellujäämise määr katse vältel on kontrollrühmas vähemalt 90 %;

— keskkonnatingimused on konkreetse liigi puhul ühesugused ning kasvukeskkond sisaldab ühesuguses koguses ja samast allikast pärit mulda, kasvu toetavaid koostisosi või substraati.

VÕRDLUSKEMIKAAL

7. Võrdluskemikaali abil võib korrapäraselt kontrollida, kas katsetulemused, konkreetsete katsetaimede reaktsioon ja katsetingimused on aja jooksul üldjoontes samaks jäänud. Teise võimalusena võib kasutada varasemaid kontrolltaimede biomassi- või kasvuandmeid, mis võimaldavad teha laboritevahelist kvaliteedikontrolli ja hinnata katsesüsteemi usaldusväärsust konkreetses laboris.

MEETODI KIRJELDUS

Looduslik muld ja kunstlik substraat

8. Taimi võib kasvatada pottides, kasutades liivsavimulda või kerget või keskmist saviliivmulda, mis sisaldab kuni 1,5 % orgaanilist süsinikku (umbes 3 % orgaanilist ainet). Võib kasutada ka müügilolevat potimulda või sünteetilist mullasegu, mis sisaldab kuni 1,5 % orgaanilist süsinikku. Savimuldasid ei tohiks kasutada, kui on teada, et uuritava kemikaali afiinsus savi suhtes on suur. Põllumuld tuleks homogeensuse tagamiseks ja suurte osakeste kõrvaldamiseks selliselt läbi sõeluda, et osakeste suurus ei oleks üle 2 mm. Tuleks esitada kasutusvalmis mulla tüüp ja lõimis, orgaanilise süsiniku protsentuaalne sisaldus, pH ja soolasisaldust kajastav elektrijuhtivus. Muld tuleks klassifitseerida vastavalt standardsele klassifitseerimissüsteemile (11). Mulla patogeenide mõju vähendamiseks võib mulla pastöriseerida või seda kuumtöödelda.

9. Loodusliku mulla puhul võib selle füüsikalis-keemiliste omaduste ja mikroobipopulatsioonide varieeruvuse tõttu olla tulemuste varieeruvus suurem ja nende tõlgendamine raskem. Need muutujad mõjutavad omakorda mulla niiskusmahtuvust, kemikaalide sidumise võimet, aereeritust ning toitainete ja mikroelementide sisaldust. Lisaks nimetatud füüsikalistele teguritele varieeruvad ka mulla keemilised omadused, näiteks pH ja redokspotentsiaal, mis võivad mõjutada uuritava kemikaali biokättesaadavust (12, 13, 14).

10. Taimekaitsevahendite mõju hindamisel ei kasutata tavaliselt kunstlikke substraate, kuid neist võib olla kasu üldotstarbeliste kemikaalide mõju hindamisel või juhul, kui soovitakse minimeerida loodusliku mulla varieeruvust ja parandada katsetulemuste võrreldavust. Kasutatavad substraadid peaksid koosnema inertsest materjalist, mille puhul vastasmõju uuritava kemikaali, kasutatava lahusti või mõlemaga on minimaalne. On leitud, et sobivad inertsed materjalid, mis absorbeerivad uuritavat kemikaali minimaalselt ja

▼M6

mille puhul on tagatud kemikaali maksimaalne kättesaadavus seemikule juurte kaudu, on happega pestud kvartsliiv, mineraalvill ja klaashelmed (nt läbimõõduga 0,35–0,85 mm). Sobimatud substraadid on näiteks vermikuliit, perliit ja muud tugevalt absorbeerivad materjalid. Tuleks tagada taimekasvu soodustavate toitainete olemasolu, et taimedel ei tekiks toitainevaegusest tingitud stressi, ning võimaluse korral tuleks selle hindamiseks teha kontrolltaimedele keemiline analüüs või neid visuaalselt hinnata.

Katseliigi valimise kriteeriumid

11. Valitavad liigid peaksid esindama piisavalt laia spektrit, näiteks lähtuvalt nende taksonoomilisest kuuluvusest taimeriigis, nende levikust, arvukusest, elutsükliga seotud liigispetsiifilistest omadustest ja looduslikust levialast, et oleks võimalik vaadelda rida eri reaktsioone uuritavale kemikaalile (8, 10, 16, 17, 18, 19, 20). Võimaliku katseliigi valimisel tuleks arvesse võtta järgmisi kriteeriume:

— asjaomase liigi seemned on ühetaolised ja usaldusväärsest standardsest seemnepangast hõlpsalt kättesaadavad ning nende puhul on tagatud järjepidev, kindel ja ühtlane seemnete idanemine ja seemikute ühetaoline kasv;

— asjaomased taimed sobivad laborikatsetes kasutamiseks ning nendega saadavad tulemused on usaldusväärsed ja nii ühes uurimislaboris kui ka eri laborites reprodutseeritavad;

— katseliigi tundlikkus peaks vastama keskkonnas kemikaaliga kokku puutuvate taimede puhul täheldatavale tundlikkusele;

— asjaomaseid taimi on teataval määral kasutatud varasemates mürgisuse hindamise katsetes ja nende kasutamisel näiteks herbitsiididega tehtavates biokatsetes, raskmetallide mõju või soolsusest või mineraalainetest tingitud stressi hindamise katsetes või allelopaatiauuringutes on täheldatud tundlikkust paljude stressiallikate suhtes;

— käesoleva katsemeetodi puhul kasutatavad kasvutingimused on asjaomastele taimedele sobivad;

— asjaomased taimed vastavad katse nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Mõned varem kõige sagedamini kasutatud katseliigid on loetletud 2. liites ja võimalikud põllumajanduskultuuride hulka mittekuuluvad liigid 3. liites.

12. Katses kasutatavate liikide arv sõltub asjakohastest õiguslikest nõuetest ja seepärast seda käesolevas katsemeetodis ei määratleta.

Uuritava kemikaaliga töötlemine

13. Kemikaaliga töötlemiseks tuleks kasutada sobivat kandeainet (nt vesi, atsetoon, etanool, polüetüleenglükool, kummiaraabik, liiv). Katses võib kasutada ka segusid (kindlaksmääratud koostisega tooted või valmistised), mis sisaldavad toimeaineid ja eri abiaineid.

Kemikaali viimine mulda või kunstlikku substraati

14. Vees lahustuvad või vees suspensiooni moodustavad kemikaalid võib lisada veele ja seejärel segada saadud lahuse sobiva segamisseadme abil mullaga. Sellist tüüpi katse võib olla sobiv juhul, kui kokkupuude kemikaaliga toimub mulla või mullapoorides oleva vee kaudu ja soovitakse hinnata kemikaali omastamist juurte kaudu. Uuritava kemikaali lisamisel ei tohiks vedeliku kogus ületada mulla veemahutavust. Lisatav veekogus peaks olema iga katses kasutatava kontsentratsiooni puhul sama ning piiratud, et hoida ära mullaosakeste kokkukleepumist.

▼M6

15. Vees raskesti lahustuvad kemikaalid tuleks lahustada sobivas lenduvas lahustis (nt atsetoon või etanool) ja segada liivaga. Seejärel saab lahusti liivast õhujoa abil kõrvaldada, segades liiva samal ajal pidevalt. Töödeldud liiv segatakse katses kasutatava mullaga. Täiendava kontrollina kasutatakse mulda, millele lisatakse üksnes lahustiga töödeldud liiva. Täiendava kontrolli ja iga kasutatava kontsentratsiooni puhul lisatakse ühesugune kogus liiva, mis on lahustiga segatud ja millest lahusti on kõrvaldatud. Kui uuritav tahke kemikaal on lahustumatu, segatakse see sobiva segamisseadme abil kuiva mullaga. Seejärel viiakse muld pottidesse ja sellesse külvatakse viivitamata seemned.

16. Kui mulla asemel kasutatakse kunstlikku substraati, võib vees lahustuva kemikaali lahustada vahetult enne katse algust toitainelahuses. Kui kemikaal on vees lahustumatu, kuid seda on võimalik lahusti abil vees suspendeerida, tuleks see lisada toitainelahusesse koos lahustiga. Vees lahustumatu kemikaal, mille jaoks ei ole mittemürgist vees lahustuvat lahustit, tuleks lahustada sobivas lenduvas lahustis. Lahus segatakse liiva või klaashelmestega, segu pannakse vaakumpöördaurustisse, lahustil lastakse aurustuda ning selle tulemusena saadakse ühtlaselt kemikaaliga kaetud liiv või helmed. Enne pottide täitmist tuleks kemikaal teatava koguse kaalutud helmeste pinnalt sama orgaanilise lahustiga ekstraheerida ja seda analüüsida.

Mullapinna töötlemine

17. Taimekaitsevahendite puhul kasutatakse uuritava kemikaaliga töötlemiseks sageli katselahuse pihustamist mullapinnale. Kõnealuste katsete tegemiseks kasutatavad seadmed, sealhulgas uuritava kemikaali lahuse valmistamiseks ja mullapinnale kandmiseks kasutatavad seadmed, peaksid olema sellise ehituse ja töökindlusega, et nende abil saaks teha täpseid katseid, mille puhul oleks tagatud katvuse reprodutseeritavus. Katvus peaks olema kõikjal mullapinnal ühtlane. Tuleks hoolikalt jälgida, et kemikaal ei adsorbeeruks seadmetele (nt plasttorud, lipofiilsed kemikaalid või terasosad ja -detailid) ega reageeriks nendega. Uuritavat kemikaali pihustatakse mullapinnale viisil, millega jäljendatakse tüüpilist töötlemist pihustusseadme abil. Üldjuhul peaks pihustatavad kogused jääma põllumajanduses tavapäraselt kasutatavasse vahemikku ning asjaomased kogused (vee hulk jne) tuleks märkida katseprotokolli. Tuleks valida sellist tüüpi otsik, mille puhul mullapind saaks ühtlaselt kaetud. Lahusti või kandeaine kasutamise korral tuleks moodustada täiendav rühm kontrolltaimi, mille puhul lisatakse üksnes lahustit/kandeainet. Kindlaksmääratud koostisega taimekaitsevahendite puhul ei ole see vajalik.

Uuritava kemikaali sisalduse või koguselise määra kontrollimine

18. Kasutatavaid kontsentratsioone või koguselisi määru tuleb asjakohase analüüsi teel kontrollida. Lahustuva kemikaali puhul võib kõikide katses kasutatavate kontsentratsioonide või koguseliste määrade kontrollimiseks analüüsida suurima kontsentratsiooniga katselahust ja dokumenteerida järgnevad lahjendused ning kasutada kemikaaliga töötlemiseks kaliibritud seadmeid (nt klaasist kaliibritud analüüsinõud, kaliibritud pihustusseadmed). Lahustumatu kemikaali puhul tuleb selle sisalduse tõendamiseks registreerida mullale lisatavad uuritava kemikaali kaalutud kogused. Kui on vaja tõendada homogeensust, võib olla vaja mulda analüüsida.

KATSE KÄIK

Katseplaan

19. Sama taimeliigi seemned külvatakse pottidesse. Seemnete arv poti kohta sõltub liigist, poti suurusest ja katse kestusest. Taimede arv potis peaks olema selline, et katse vältel oleksid tagatud sobivad kasvutingimused ja taimi ei oleks liiga palju. Maksimaalne tihedus peaks olenevalt seemnete

▼M6

suurusest olema 3–10 seemet 100 cm^2 kohta. Näiteks on taimede soovitatav tihedus 15-sentimeetrise läbimõõduga potis maisi, sojaoa, tomati, kurgi ja suhkrupeedi puhul 1–2 taime, rapsi ja herne puhul 3 taime ning sibula, nisu ja muude väikese seemnega taimede puhul 5–10 taime. Seemnete ja paralleelpottide arv (paralleelüksusena käsitatakse potti, seepärast ei ole samas potis kasvavad taimed vaadeldavad paralleelidena) peaks olema optimaalse statistilise analüüsi jaoks piisav (21). Tuleks tähele panna, et katseliikidel, mille puhul kasutatakse väiksemat arvu suuri seemneid poti (paralleelüksuse) kohta, on varieeruvus suurem kui katseliikidel, mille puhul on võimalik kasutada suuremat arvu väikseid seemneid poti kohta. Sellist varieeruvust saab minimeerida igasse potti võrdse arvu seemnete külvamisega.

20. Et veenduda, et täheldatav mõju tuleneb üksnes kokkupuutest uuritava kemikaaliga või on üksnes sellega seotud, kasutatakse kontrollrühmi. Sobiv kontrollrühm peaks olema katserühmaga identne kõiges muus peale uuritava kemikaaliga kokkupuute. Kõik samas katses kasutatavad katsetaimed, sealhulgas kontrolltaimed, peaksid pärinema samast allikast. Ebavõrdse jaotuse ärahoidmiseks tuleb katse- ja kontrollpotid määrata juhuslikult.

21. Tuleks hoiduda insektitsiidi või fungitsiidiga kaetud seemnete (st puhitud seemnete) kasutamisest. Mõni reguleeriv asutus lubab siiski kasutada teatud mittesüsteemseid kontaktfungitsiide (nt kaptaan, tiraam) (22). Kui muret teevad seemnetega levivad patogeenid, võib seemneid hoida lühikest aega lahjas, viieprotsendilises hüpokloriti lahuses ning seejärel neid voolava veega korralikult loputada ja need kuivatada. Töötlemine mõne muu taimekaitsevahendiga ei ole lubatud.

Katsetingimused

22. Katsetingimused peaksid üldjoontes vastama tingimustele, mis on vajalikud katses kasutatavatesse liikidesse ja sortidesse kuuluvate taimede tavapäraseks kasvuks (katsetingimuste näited on esitatud 4. liites). Tärkavaid taimi tuleks kasvatada kontrollitava keskkonnaga kambris, fütotronis või kasvuhoones kooskõlas hea aiandustavaga. Taimekasvatuseks ette nähtud ruumi kasutamisel hõlmab see tava harilikult temperatuuri, õhuniiskuse, süsihappegaasi sisalduse, valguse (valgustustiheduse, lainepikkuse, fotosünteesiks sobiva kiirguse), valgustusperioodi, kastmisviisi jmt reguleerimist ja piisavalt sagedast (nt igapäevast) registreerimist, et tagada hea taimekasv, mida hinnatakse asjaomase liigi kontrolltaimede kasvu alusel. Kasvuhoones tuleks temperatuuri reguleerida ventilatsiooni-, kütte- ja/või jahutussüsteemi abil. Kasvuhoones tehtava katse puhul soovitatakse üldjuhul kasutada järgmisi tingimusi:

— temperatuur: 22 ± 10 °C;

— õhuniiskus: 70 ± 25 %;

— valgustusperiood: vähemalt 16 tundi;

— valgustustihedus: 350 ± 50 µE m^{-2} s^{-1}. Kui valgustustihedus lainepikkuste vahemikus 400–700 nm langeb alla 200 µE m^{-2} s^{-1}, võib olla vaja kasutada lisavalgustust, välja arvatud teatud liikide puhul, mille valgusevajadus on väiksem.

Keskkonnatingimusi tuleks katse vältel jälgida ja need registreerida. Taimi tuleks kasvatada mittepoorsetes plast- või glasuuritud pottides, mille alla on paigutatud kandik või alustass. Potte võib korrapäraselt ümber paigutada, et

▼M6

minimeerida kasvukeskkonna tingimuste erinevustest tulenevat varieeruvust taimede kasvus. Potid peavad olema tavapärase kasvu võimaldamiseks piisava suurusega.

23. Taimede elujõulisuse tagamiseks võib mullale lisada toitaineid. Lisatoitainetega varustamise vajaduse ja sageduse üle saab otsustada kontrolltaimede vaatlemise põhjal. Soovitatakse kasutada katsenõude altkastmist (nt klaaskiudnööri abil). Alguses võib siiski kasutada ülaltkastmist, et aidata kaasa seemnete idanemisele ja hõlbustada mullapinna töötlemise puhul kemikaali kandumist mulda.

24. Konkreetsed kasvutingimused peaksid olema katses kasutatava liigi ja uuritava kemikaali jaoks sobivad. Kontrolltaimi ja kemikaaliga kokku puutuvaid taimi tuleks kasvatada samades keskkonnatingimustes, kuid tuleks võtta asjakohased meetmed, et takistada uuritava kemikaali (nt lenduva kemikaali) ülekandumist ühest katserühmast teise ja katserühmast kontrollrühma.

Ühel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse

25. Ühel kemikaali kontsentratsioonil või koguselisel määral põhineva katse (piirsisalduskatse) jaoks sobiva kontsentratsiooni või koguselise määra kindlaksmääramisel tuleb arvesse võtta mitut tegurit. Üldotstarbeliste kemikaalide puhul hõlmab see kemikaali füüsikalis-keemilisi omadusi. Taimekaitsevahendite puhul tuleb arvesse võtta uuritava kemikaali füüsikalis-keemilisi omadusi ja kasutusrežiimi, selle maksimaalset kontsentratsiooni või töötlemisel kasutatavat kogust, töötlemiskordade arvu hooaja kohta ja/või kemikaali püsivust. Et teha kindlaks, kas üldotstarbeline kemikaal on fütotoksiline, võib olla asjakohane teha katse maksimaalsel sisaldusel 1 000 mg kuiva mulla kilogrammi kohta.

Kogusevahemiku leidmise katse

26. Vajaduse korral võib teha kogusevahemiku leidmise katse, et leida lõplikus koguse ja mõju vahelise sõltuvuse uuringus kasutamiseks sobivad kontsentratsioonid või koguselised määrad. Kogusevahemiku leidmise katses kasutatavad kontsentratsioonid või koguselised määrad tuleks valida suure intervalliga (nt 0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg kuiva mulla kilogrammi kohta). Taimekaitsevahendite puhul võib kontsentratsioonide või koguseliste määrade valimisel lähtuda soovitatavast või maksimaalsest kontsentratsioonist või töötlemisel kasutatavast kogusest ning kasutada sellest näiteks 1/100, 1/10 ja 1/1.

Mitmel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse

27. Mitmel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhineva katse eesmärk on teha kindlaks koguse ja mõju vaheline sõltuvus ja määrata vastavalt reguleerivate asutuste nõuetele EC_x või ER_x väärtus taimede tärkamise, biomassi ja/või visuaalselt hinnatava mõju puhul, kasutades võrdlusalusena kemikaaliga mitte kokku puutuvaid kontrolltaimi.

28. Kontsentratsioonide või koguste arv ja intervall peaks olema piisav, et võimaldada usaldusväärselt hinnata koguse ja mõju vahelist sõltuvust, koostada regressioonivõrrand ja arvutada hinnanguline EC_x või ER_x väärtus. Valitud kontsentratsioonid või koguselised määrad peaksid hõlmama määratavaid EC_x või ER_x väärtusi. Kui on näiteks vaja leida EC_{50} väärtus, on soovitatav kasutada katses koguseid, mille puhul mõju ulatus on 20–80 %. Selle saavutamiseks soovitatakse kasutada lisaks kemikaaliga töötlemata

▼M6

kontrollile vähemalt viit kontsentratsiooni või koguselist määra geomeetrilises jadas, mille tegur ei ole suurem kui kolm. Paralleelpottide arv igas katse- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt neli ja seemnete üldarv vähemalt 20. Teatud taimede puhul, mille seemnete idanevuse määr on väike või mille kasv tavapäraselt varieerub, võib olla vaja kasutada katse statistilise usaldusväärsuse tõstmiseks suuremat arvu paralleelpotte. Kui katses kasutatakse suuremat arvu kontsentratsioone või koguselisi määru, võib paralleelpottide arvu vähendada. Kui soovitakse leida täheldatavat toimet mitteavaldavat kontsentratsiooni, võib olla vaja kasutada vajaliku statistilise usaldusväärsuse saavutamiseks suuremat arvu paralleelpotte (23).

Vaatlused

29. Vaatlusperioodi vältel, st 14–21 päeva jooksul pärast 50 % kontrolltaimede (vajaduse korral ka lahustiga kokku puutuvate kontrolltaimede) tärkamist vaadeldakse taimi sageli (vähemalt kord nädalas ja võimaluse korral iga päev) ning jälgitakse tärkamist, visuaalselt hinnatavaid fütotoksilisuse ilminguid ja suremust. Katse lõpus tuleks registreerida tärganud taimede protsentuaalne osakaal ja ellujäänud taimede biomass, samuti silmaga nähtav kahjulik mõju taime eri osadele. See kahjulik mõju hõlmab tärganud seemikute ebanormaalset välimust, kasvu kängumist, kloroosi, värvusemuutusi, suremist ja mõju taimede arengule. Lõpliku biomassi mõõtmiseks võib kasutada ellujäänud taimede võrse lõplikku keskmist kuivmassi; selleks lõigatakse võrse mullapinna tasandilt ära ja kuivatatakse seda 60 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu. Teise võimalusena võib lõpliku biomassi määramiseks kasutada võrse märgmassi. Kui reguleerivad asutused seda nõuavad, võib mõõdetav näitaja olla ka võrse kõrgus. Vaadeldava toksilise mõju määramiseks tuleks kasutada ühtset silmaga nähtavate kahjustuste hindamise süsteemi. Näited kvalitatiivse ja kvantitatiivse visuaalse hindamise kohta on esitatud allikates 23 ja 24.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Statistiline analüüs

Ühel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse

30. Iga taimeliigi kohta saadud andmete analüüsimiseks tuleks kasutada sobivat statistilist meetodit (21). Tuleks esitada katses kasutatud kontsentratsiooni või koguselise määra puhul täheldatava toime määr või teave selle kohta, et toime jääb allapoole teatavat määra (nt kontsentratsiooni või koguselise määra *y* puhul täheldatav mõju on < *x* %).

Mitmel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse

31. Koostatakse koguse ja mõju vahelist sõltuvust väljendav regressioonivõrrand. Võib kasutada eri mudeleid: näiteks võib binaarse muutujana käsitletava tärkamise puhul sobida EC_x või ER_x (nt EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) väärtuse ja asjaomaste usalduspiiride leidmiseks logit-, probit-, Weibulli, Spearmani-Kärberi või kohandatud Spearmani-Kärberi meetod. Seemikute kasvu (kaalu ja kõrguse) kui lõppnäitajana hinnatava pideva muutuja puhul võib EC_x või ER_x väärtuse ja vastavate usalduspiiride määramiseks kasutada sobivat regressioonanalüüsi (nt Bruce'i-Versteegi mittelineaarset regressiooni (25)). Võimaluse korral peaks R^2 olema kõige tundlikuma liigi puhul alati 0,7 või suurem ja mõju ulatus katses kasutatavate kontsentratsioonide või koguseliste määrade juures hõlmama vahemikku 20–80 %. Kui soovitakse määrata täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon, tuleks eelistada suure usaldusväärsusega statistilisi mudeleid, mille valimisel tuleks lähtuda andmete jaotusest (21, 26).

Katseprotokoll

32. Katseprotokollis tuleks esitada katsetulemused koos katsetingimuste üksikasjaliku kirjelduse, tulemusi käsitleva põhjaliku arutelu, andmeanalüüsi tulemuste ja nende põhjal tehtud järeldustega. Tuleks esitada tulemusi käsitlev kokkuvõtlik tabel ja lühikokkuvõte. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

▼**M6**

Uuritav kemikaal:

— uuritava kemikaali identifitseerimisandmed ja asjakohased omadused (nt log P_{ow}, lahustuvus vees, aururõhk ning võimaluse korral säilivus ja käitumine keskkonnas);

— üksikasjad katselahuse valmistamise ja punkti 18 kohase kasutatavate kontsentratsioonide kontrollimise kohta.

Katseliik:

— üksikasjalikud andmed katseorganismi kohta: liik/sort, sugukond, teaduslik nimetus ja tavanimetus, võimalikult üksikasjalik teave seemnete päritolu kohta (st tarnija nimi, idanemise protsentuaalne määr, seemnete suurusklass, partii number, seemnete kogumise aasta või kasvuperiood, idanemise hindamise kuupäev), elujõulisus jne;

— katses kasutatud ühe- ja kaheiduleheliste liikide arv;

— liikide valimise põhjendus;

— seemnete hoiustamise, töötlemise ja säilitamise kirjeldus.

Katsetingimused:

— katseruum (nt kasvukamber, fütotron või kasvuhoone);

— katsesüsteemi kirjeldus (nt poti mõõtmed, poti materjal ja mulla kogus);

— mulla omadused (mulla lõimis või tüüp: mullaosakeste jaotus ja liigitus, füüsikalised ja keemilised omadused, sealhulgas orgaanilise aine protsentuaalne sisaldus, orgaanilise süsiniku protsentuaalne sisaldus ja pH);

— mulla/substraadi (nt muld, kunstlik pinnas, liiv jm) ettevalmistamine enne katset;

— toitainete lisamise korral nende kirjeldus;

— uuritava kemikaaliga töötlemine: töötlemismeetodi kirjeldus, seadmete, kokkupuutemäärade ja asjaomaste koguste, sealhulgas kemikaalisisalduse kontrollimise kirjeldus, kaliibrimismeetodi kirjeldus ja töötlemise ajal valitsenud keskkonnatingimuste kirjeldus;

— kasvutingimused: valgustustihedus (nt fotosünteesiks sobiva kiirguse puhul), valgustusperiood, maksimaalne ja minimaalne temperatuur, kastmisrežiim ja -meetod, väetamine;

— seemnete arv poti kohta, taimede arv kemikaali iga koguse puhul, paralleelpottide arv iga kokkupuutemäära puhul;

— kontrollide tüüp ja arv (negatiivsed ja/või positiivsed kontrollid, vajaduse korral lahustiga kontrollid);

— katse kestus.

Tulemused:

— tabel, mis sisaldab kõiki lõppnäitajaid iga paralleelpoti, kasutatud kontsentratsiooni või koguselise määra ja liigi kohta;

— tärganud taimede arv ja protsentuaalne määr võrreldes kontrollrühma näitajaga;

— taimede mõõdetud biomassi (võrsete kuivmass või märgmass) protsentuaalne määr võrreldes kontrollrühma näitajaga;

▼M6

— kui mõõdeti võrsete kõrgust, siis selle protsentuaalne määr võrreldes kontrollrühma näitajaga;

— uuritava kemikaali põhjustatud visuaalselt hinnatavate kahjustuste protsentuaalne määr võrreldes kontrollrühmaga ning selliste kahjustuste kvalitatiivne ja kvantitatiivne kirjeldus (kloroos, nekroos, närbumine, varre või lehtede moondumine, samuti sellise mõju puudumine);

— kui visuaalselt hinnatavate kahjustuste puhul kasutatakse hindamisskaalat, siis sellise skaala kirjeldus;

— ühel kogusel põhineva katse puhul tuleks märkida kahjustuste protsentuaalne määr;

— EC_x või ER_x (nt EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) väärtus ja asjaomased usalduspiirid. Regressioonanalüüsi tegemise korral esitatakse regressioonivõrrandiga seotud standardviga ja konkreetsete parameetrite (nt tõus, algordinaat) hinnangulise väärtuse standardviga;

— täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (ja vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon), kui see on teada;

— kasutatud statistiliste meetodite ja eelduste kirjeldus;

— graafik eespool kirjeldatud andmete ning koguse ja mõju vahelise sõltuvuse kohta katses kasutatud liigi puhul.

Kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse ajal täheldatavad ebatavalised ilmingud.

KIRJANDUS

(1) Schrader, G., Metge, K., ja Bahadir, M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Appl. Soil Ecol*. 7: 189–193.

(2) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). ISO 11269-1: Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1995). ISO 11269-2: Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) USA Materjalide Katsetamise Ühing (ASTM) (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) USA Keskkonnakaitseamet (1982). FIFRA, 40CFR, osa 158.540. Alajaotis J, osad 122-1 ja 123-1.

(6) USA Keskkonnakaitseamet (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background – Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR X31-201 (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1 (1993). Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K. E., ja Keddy, C. J. (1993). Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Technical Report Series No. 145. Canadian Wildlife Service (peakorter), Environment Canada, Hull, Québec, Kanada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., ja Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms – A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd*. 48.

(10) Hale, B., Hall, J. C., Solomon, K., ja Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario, Kanada.

(11) Mulla lõimise klassifitseerimine (USA põllumajandusministeeriumi ja ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsiooni süsteemid): *Weed Sci*. 33, Suppl. 1 (1985) ja *Soil Sci. Soc. Am. Proc*. 26: 305 (1962).

(12) Audus, L. J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. Väljaandes: Audus, L. J. (toim.), The Physiology and Biochemistry of Herbicides. London, New York, Academic Press, NY, 5. peatükk, lk 163–206.

(13) Beall, M. L., Jr., ja Nash, R. G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil. *J. Agro*. 61: 571–575.

(14) Beetsman, G. D., Kenney, D. R., ja Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties. *J. Agro*. 61: 247–250.

(15) USA Toidu- ja Ravimiamet (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 lk, USA Toidu- ja Ravimiamet, Washington, DC.

(16) McKelvey, R. A., Wright, J. P., Honegger, J. L., ja Warren, L. W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. *Pest Manag. Sci*. 58: 1161–1174.

(17) Boutin, C., Elmegaard, N., ja Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. *Ecotoxicology* 13: 349–369.

(18) Boutin, C., ja Rogers, C. A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. *Ecotoxicology* 9: 255–271.

(19) Boutin, C., ja Harper, J. L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. *J. Ecol*. 9: 155–271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T. E., Batchelor, S. P., ja Maguire, R. J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environ. Toxicol. Chem*. 19: 2532–2541.

(21) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(22) Hatzios, K. K., ja Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. *Rev. Weed Sci*. 1: 1–63.

(23) Hamill, P. B., Marriage, P. B., ja Friesen, G. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. *Weed Sci*. 25: 386–389.

(24) Frans, R. E., ja Talbert, R. E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. Väljaandes: Truelove, B. (toim.), Research Methods in Weed Science, 2. väljaanne. Southern Weed Science Society, Auburn, lk 15–23.

(25) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485–1492.

(26) Käesoleva lisa peatükk C.33 „Vihmausside (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*) sigivuse katse”.

▼M6

1. liide

Mõisted

Toimeaine – aine, millel on ettenähtud spetsiifiline bioloogiline mõju (nt putukatõrje, taimehaiguste tõrje või umbrohutõrje töödeldaval alal); tuntud ka kui tehnilise puhtusastmega toimeaine.

Kemikaal – aine või segu.

Taimekaitsevahend või **pestitsiid** – spetsiifilise bioloogilise mõjuga materjal, mida kasutatakse eesmärgiga kaitsta taimi kahjurite (nt seenhaigused, putukad ja konkureerivad taimed) eest.

EC_x või **ER_x** (vastavalt **kontsentratsioon** või **kogus, mille puhul mõju ulatus on x %**) – kontsentratsioon või kogus, mille juures katse lõppnäitajale avalduva ebasoodsa mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest (nt EC_{25}/ER_{25} ja EC_{50}/ER_{50} tähistavad kontsentratsiooni või koguselist määra, mille puhul seemikute tärkamise määr, võrsete kaal või ellujäänud taimede lõpparv väheneb või visuaalselt hinnatavate kahjustuste määr suureneb vastavalt 25 % ja 50 % võrra).

Tärkamine – koleoptiili või idulehe ilmumine mullapinnale.

Valmistis – asjaomast toimeainet sisaldav kaubanduslik valmistoode, tuntud ka kui lõppvalmistis ([1]) ja tüüpiline lõpptoode.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) – uuritava kemikaali väikseim kontsentratsioon, mille juures täheldatakse teatavat mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul täheldatakse sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju ning selline kontsentratsioon on suurem kui täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon.

Muud kui sihttaimed – taimed, mis paiknevad väljaspool sihttaimede ala. Taimekaitsevahendite puhul tähistatakse selle mõistega tavaliselt taimi, mis paiknevad väljaspool kemikaaliga töötlemise ala.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) – uuritava kemikaali suurim kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

Fütotoksilisus – asjaomase kemikaali toimel ilmnevad kahjulikud kõrvalekalded taimede tavapärasest välimusest ja kasvust, mida mõõdetakse ja hinnatakse visuaalselt.

Paralleelüksus – kontrollrühma ja/või katserühma esindav katseüksus. Käesoleva katsemeetodi puhul on paralleelüksusena määratletud pott.

Visuaalne hindamine – silmaga nähtavate kahjustuste hindamine taimede väliskuju, elujõulisuse, väärarengute, kloroosi, nekroosi ja üldise välimuse põhjal võrdluses kontrolltaimedega.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

([1]) Lõppvalmistis – asjaomast toimeainet sisaldav turustatav valmistoode.

▼**M6**

2. liide

Taimekatsetes varem kasutatud liikide loetelu

Sugukond	Liik	Tavanimetus
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Porgand
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Päevalill
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Aedsalat
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Valge sinep
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Hiina kapsas
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Raps
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Peakapsas
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Naeris
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Salatkress
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Redis
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Suhkrupeet
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Kurk
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Sojauba
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Munguba
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Põõsasuba, lattuba, harilik aeduba
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Hernes
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Põld-lambalääts
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Harilik nõiahammas
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Aasristik
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Vikk
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Lina
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Harilik tatar
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Tomat

▼**M6**

Sugukond	Liik	Tavanimetus
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amarylladaceae)	*Allium cepa*	Harilik sibul
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Harilik kaer
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Harilik oder
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Karjamaa-raihein
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Harilik riis
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Harilik rukis
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Terasorgo, sudaani sorgo
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Harilik nisu
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Harilik mais

▼M6

3. liide

Põllumajanduskultuuride hulka mittekuuluvate võimalike liikide loetelu

Võimalike fütotoksilisuse hindamiseks sobivate liikide OECD loetelu

Märkus: allpool esitatud tabel sisaldab teavet 52 põllumajanduskultuuride hulka mittekuuluva liigi kohta (allikaviited on märgitud iga kande puhul sulgudes). Seemikute tärkamise määrad on esitatud avaldatud kirjanduse põhjal ja üksnes üldise ettekujutuse loomiseks. Konkreetsed katsetulemused võivad sõltuvalt seemnete päritolust ja muudest teguritest varieeruda.

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ([1]) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperioood ([2])	Külvamissügavus (mm) ([3])	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ([4])	Eritöötlus ([5])	Mürgisuse hindamise katse ([6])	Seemnete tarnijad ([7])	Muud allikaviited ([8])
APIACEAE *Torilis japonica* (jaapani harjasputk)	Ü, K; häiritud kooslusega alad, hekid, karjamaad (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	V = P (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	Külmtöötlus (7, 14, 18, 19); küpsemine võib olla vajalik (19); pimedus pärsib idanemist (1, 19); eritöötluseta (5)	PÄRAST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (harilik kirikakar)	M; rohumaad, haritavad põllud, rohukamar (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	V = P (14)	0 (4)	3 (50 %) (19); 11 (100 %) (18)	Kiirgus ei mõjuta idanemist (18, 19); eritöötluseta (4, 14)	PÄRAST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (rukkilill)	Ü; põllud, teeperved, lagealad (16)	4,1–4,9 (4, 14)	V = P (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	Eritöötluseta (2, 4)	PÄRAST (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (must jumikas)	M; põllud, teeperved, lagealad (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	3 (50 %) (19); 4 (97 %) (18)	Küpsemine võib olla vajalik (18, 19); pimedus pärsib idanemist (19); eritöötluseta (5, 14, 26)	PÄRAST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (aedvaak)	M; häiritud kooslusega niisked alad (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		Eritöötluseta (4)	PÄRAST (4)	A, F	

▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ([1]) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ([2])	Külvamissügavus (mm) ([3])	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ([4])	Eritöötlus ([5])	Mürgisuse hindamise katse ([6])	Seemnete tarnijad ([7])	Muud allikaviited ([8])
Leontodon hispidus (kare seanupp)	M; põllud, teeperved, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	4 (50 %) (19); 7 (80 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (17, 18, 19); eritöötluseta (5, 23)	PÄRAST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (karvane päevakübar)	K, M; häiritud kooslusega alad (16)	0,3 (4, 14)	V = P (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	Eritöötluseta (4, 14, 33)	PÄRAST (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (kanada kuldvits)	M; karjamaad, lagendikud (16)	0,06–0,08 (4, 14)	V = P (11)	0 (4)	14–21 (11)	Segatakse võrdse koguse liivaga ja hoitakse 24 tundi giberelliinhappe lahuses kontsentratsiooniga 500 ppm (11); eritöötluseta (4)	PÄRAST (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (pensilvaania väärtakjas)	Ü; põllud, lagealad (16)	25–61 (14, 29)		0 (1); 5 (29)		Pimedus võib idanemist pärssida (1); hoitakse 12 tundi soojas vees (29)	ENNE ja PÄRAST (31)	A	
Xanthium spinosum (astel-väärtakjas)	Ü; lagealad (16)	200 (14)	V = P (14); V > P (6)	10 (6)		Skarifitseerimine (14); eritöötluseta (6)	ENNE ja PÄRAST (6)	A	
Xanthium strumarium (kallas-väärtakjas)	Ü; põllud, lagealad (16)	67,4 (14)	V = P (14)	10–20 (6, 21)		Eritöötluseta (6, 14, 21)	ENNE ja PÄRAST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (aas-jürilill)	M; põllud, teeperved, rohukamar (16, 19)	0,6 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	5 (50 %) (19); 15 (98 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19); eritöötluseta (5, 14, 22)	PÄRAST (5, 22)	F	

▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ([1]) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperioo-d ([2])	Külvamissü-gavus (mm) ([3])	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ([4])	Eritöötlus ([5])	Mürgisuse hinda-mise katse ([6])	Seemnete tarnijad ([7])	Muud allikaviited ([8])
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (harilik käokann)	M (16)	0,21 (14)	V = P (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	Küpsemine võib olla vajalik (18); eritöötluseta (5, 14, 15, 22–26)	PÄRAST (5, 15, 22–26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (valge hanemalts)	Ü; põlluservad, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	V = P (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	Töötlemisviis sõltub seemnete värvusest (19); puhkeperiood kuivladustamisel (19); pimedus pärsib idanemist (1, 18, 19); külmtöötlus (18); eritöötluseta (14, 34)	ENNE ja PÄRAST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (liht-naistepuna)	M; põllud, haritavad maad, lagealad (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	V = P (14)	0 (1, 19)	3 (19); 11 (90 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (1, 18, 19); eritöötluseta (5, 14, 15, 25, 27)	PÄRAST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (luuderohi-lehtertapp)	Ü; teeperved, lagealad, viljapõllud (16)	28,2 (14)	V > P (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	Kiirgus ei mõjuta idanemist (1); eritöötluseta (6, 21)	ENNE ja PÄRAST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (visa lõikhein)	M; haritavad maad, karjamaad, teeperved (16, 30)	0,2 (14)	V = P (14)	0 (1); 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	Pimedus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (6, 10, 14)	ENNE ja PÄRAST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (harilik nõiahammas)	M; rohualad, teeperved, lagealad (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	Skarifitseerimine (14, 19); kiirgus ei mõjuta idanemist (18, 19); eritöötluseta (23, 25)	PÄRAST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ([1]) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ([2])	Külvamissügavus (mm) ([3])	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ([4])	Eritöötlus ([5])	Mürgisuse hindamise katse ([6])	Seemnete tarnijad ([7])	Muud allikaviited ([8])
Senna obtusifolia (tömbilehine kassia)	Ü; niisked metsad (16)	23–28 (9)	V = P (14); V > P (9)	10–20 (6,9)		Seemneid hoitakse 24 tundi vees (9); skarifitseerimine (14); seemnete elujõulisus on sõltuvalt värvusest erinev (1); eritöötluseta (6)	PÄRAST (6,9)	A	
Sesbania exaltata (koloraado sesbaania)	Ü; lammimullad (16)	11–13 (9, 14)	V > P (9)	10–20 (9, 21)		Seemneid hoitakse 24 tundi vees (9); kiirgus ei mõjuta idanemist (1); eritöötluseta (21)	ENNE ja PÄRAST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (aasristik)	M; põllud, teeperved, haritavad maad (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	Skarifitseerimine (14, 18); küpsemine võib olla vajalik (19); kiirgus ei mõjuta idanemist (1, 19); eritöötluseta (5)	PÄRAST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (lääne-südamerohi)	M; lagendikud (16)	0,75–1,0 (4, 14)	V = P (14)	0 (4)		Eritöötluseta (4, 14)	PÄRAST (4)	F	
Mentha spicata (rohemünt)	M; niisked alad (16)	2,21 (4)		0 (4)		Eritöötluseta (4)	PÄRAST (4)	F	
Nepeta cataria (harilik naistenõges)	M; häiritud kooslusega alad (16)	0,54 (4, 14)	V = P (14)	0 (4)		Eritöötluseta (2, 4, 14)	PÄRAST (2,4)	F	

▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ([1]) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ([2])	Külvamissügavus (mm) ([3])	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ([4])	Eritöötlus ([5])	Mürgisuse hindamise katse ([6])	Seemnete tarnijad ([7])	Muud allikaviited ([8])
Prunella vulgaris (harilik käbihein)	M; haritavad põllud, rohualad, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	V = P (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19); 7 (91 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19); suuremate seemnete idanevuse määr on suurem (1); eritöötluseta (4, 14, 22)	PÄRAST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (harilik tõnnike)	M; rohumaad, põlluservad (19)	14–18 (14, 19)	V = P (14)		7 (50 %) (19)	Eritöötluseta (5, 14, 22)	PÄRAST (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilon theophrasti* (pärn-abuutilon)	Ü; põllud, lagealad (16)	8,8 (14)	V = P (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	Skarifitseerimine (14); eritöötluseta (5, 10, 21)	ENNE ja PÄRAST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (torkav siida)	Ü; põllud, teeperved (16)	3,8 (14)	V = P (14)	10–20 (6, 21)		Skarifitseerimine (14); kiirgus ei mõjuta idanemist (1); eritöötluseta (6, 21)	ENNE ja PÄRAST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (kukemagun)	Ü; põllud, haritavad maad, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	V = P (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	Külmtöötlus ja skarifitseerimine (1, 19, 32); eritöötluseta (4, 14, 29)	PÄRAST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (harilik kastehein)	Muru, karjamaad (16)	0,07 (14)	V > P (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	Pimedus pärsib idanemist (1, 17–19); eritöötluseta (10)	PÄRAST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (põld-rebasesaba)	Ü; põllud, lagealad (16)	0,9–1,6 (29, 34)	V = P (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	Skarifitseerimine (14); töötlus KNO_3 lahusega, mille kontsentratsioon on 101 mg/l (14); stratifitseerimine soojas (1); pimedus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (34)	ENNE ja PÄRAST (28, 34)	A	32

▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ([1]) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperioo-d ([2])	Külvamissü-gavus (mm) ([3])	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ([4])	Eritöötlus ([5])	Mürgisuse hinda-mise katse ([6])	Seemnete tarnijad ([7])	Muud allikaviited ([8])
Avena fatua (tuulekaer)	Ü; haritavad alad, lagealad (16)	7–37,5 (14, 30)	V = P (14); V > P (6)	10–20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	Skarifitseerimine (7, 32); pimedus pärsib idanemist (1); külmtöötlus (1, 18); eritöötlu-seta (6, 10, 14)	ENNE ja PÄRAST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (müürluste)	Ü; põllud, teeperved, haritavad maad (16)	0,45–2,28 (14, 29)	V = P (14)	3 (29)		Küpsemisperiood (1, 7, 32); valgus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (14)	ENNE ja PÄRAST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (harilik sugapea)	M; põllud, teeperved, lagealad (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	V = P (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	Kiirgus ei mõjuta idanemist (19); eritöötluseta (14, 29)	PÄRAST (5)	A	
Digitaria sanguinalis (verev paelhirss)	Ü; põllud, rohukamar, lagealad (16)	0,52–0,6 (14, 30)	V = P (14)	10–20 (21)	7 (75 %), 14 (94 %) (7)	Skarifitseerimine, külmtöötlus ja küpsemine (1, 7, 14, 32); töötlus KNO_3 lahusega, mille kontsentratsioon on 101 mg/l (14); pimedus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (21)	ENNE ja PÄRAST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crus-galli (tähk-kukehirss)	Ü (16)	1,5 (14)	V = P (14); V > P (3)	10–20 (7, 21)		Skarifitseerimine (7, 32);; kiirgus ei mõjuta idanemist (1); eritöötluseta (3, 14, 21)	ENNE ja PÄRAST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (kanada orashein)	M; häiritud kooslusega jõeäärsed alad (16)	4–5 (14, 30)	V = P (11)	1 (11)	14–28 (11)	Eritöötluseta (2, 11)	PÄRAST (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (harilik aruhein)	M; põllud, niisked alad (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	V = P (14); V > P (10)	20 (10)	9 (74 %) (10); 2 (50 %) (19)	Eritöötluseta (10, 19)	PÄRAST (10)	A	7

▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ([1]) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperioo-d ([2])	Külvamissü-gavus (mm) ([3])	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ([4])	Eritöötlus ([5])	Mürgisuse hinda-mise katse ([6])	Seemnete tarnijad ([7])	Muud allikaviited ([8])
Hordeum pusillum (väike oder)	Ü; karjamaad, teeperved, lagealad (16)	3,28 (14)				Stratifitseerimine soojas (1); kiirgus ei mõjuta idanemist (1)	ENNE (31)		7
Phleum pratense (põldtimut)	M; karjamaad, haritavad põllud, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,45 (14, 19)	V > P (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10); 8 (50 %) (19)	Pimedus pärsib idanemist (19); kiirgus ei mõjuta idanemist (17); eritöötluseta (10, 14, 17, 19)	PÄRAST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (põld-konnatatar)	Ü; lagealad, teeperved (16)	5–8 (4, 14, 29)	V = P (20)	0–2 (4, 29)		Külmtöötlus 4–8 nädala vältel (1, 2, 4, 20, 29); kiirgus ei mõjuta idanemist (1)	ENNE ja PÄRAST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (kahar kirburohi)	Ü; niisked mullad (16)	1,8–2,5 (14)	V > P (6)		5 (94 %) (18)	Kiirgus ei mõjuta idanemist (1); pimedus pärsib idanemist (18); külmtöötlus (1); eritöötluseta (5)	ENNE ja PÄRAST (6)	A, E	
Polygonum pensylvanicum (pensilvaania kirburohi)	Ü; põllud, lagealad (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		Külmtöötlus 0–5 °C juures 4 nädala vältel (1, 29); pimedus pärsib idanemist (1)	ENNE (31)	A, E	
Polygonum persicaria (harilik kirburohi)	Ü; häiritud kooslusega alad, haritavad maad (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	V > P (13)	0 (19)	< 14 (13); 2 (50 %) (19)	Skarifitseerimine, külmtöötlus, töötlus giberelliinhappega (14); külmtöötlus, küpsemine (17–19); pimedus pärsib idanemist (19); eritöötluseta (13)	PÄRAST (13)	A	32

▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ([1]) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ([2])	Külvamissügavus (mm) ([3])	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ([4])	Eritöötlus ([5])	Mürgisuse hindamise katse ([6])	Seemnete tarnijad ([7])	Muud allikaviited ([8])
Rumex crispus (kärnoblikas)	M; haritavad põllud, teeperved, lagendikud (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	V = P (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19); 6 (100 %) (33)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19); küpsemine võib olla vajalik (18); eritöötluseta (4, 14, 33)	PÄRAST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (põld-varsapõlv)	Ü; haritavad põllud, lagendikud, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	Külmtöötlus, töötlus giberelliinhappega (1,14, 18, 19, 32); idanemine nõuab valgust (1); eritöötluseta (2, 4)	PÄRAST (2, 4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (kibe tulikas)	M; haritavad põllud, teeperved, lagendikud (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	V = P (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	Eritöötluseta (5, 14, 22, 24–26)	PÄRAST (5, 22, 24–26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (maamõõl)	M; hekid, niisked alad (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	5 (50 %) (19); 16 (79 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19) stratifitseerimine soojas (1); eritöötluseta (5, 14, 22, 25, 26)	PÄRAST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (roomav madar)	Ü; haritavad põllud, niisked alad, häiritud kooslusega alad (16, 19)	7–9 (14, 19)	V = P (14)		5 (50 %) (19); 6 (100 %) (18)	Külmtöötlus (1, 18, 19); kiirgus ei mõjuta idanemist (18, 19); valgus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (6, 14)	ENNE ja PÄRAST (6, 28)	A	32

▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ([1]) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ([2])	Külvamissügavus (mm) ([3])	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ([4])	Eritöötlus ([5])	Mürgisuse hindamise katse ([6])	Seemnete tarnijad ([7])	Muud allikaviited ([8])
Galium mollugo (pehme madar)	M; hekivallid, lagendikud (8)	7 (29)	V = P (14)	2 (29)		Eritöötluseta (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PÄRAST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (verev sõrmkübar)	K, M; hekid, lagendikud (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	V = P (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19); 8 (99 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (1, 17–19); eritöötluseta (4, 22–26)	PÄRAST (4, 22–26)	D, G, F	
Veronica persica (pärsia mailane)	Ü; haritavad põllud, lagendikud, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	3 (19); 5 (96 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19); külmtöötlus (18); eritöötluseta (14)	ENNE ja PÄRAST (28)	A	32

([1]) Ü = üheaastased taimed; K = kaheaastased taimed; M = mitmeaastased taimed.
([2]) Allikates 11,14 ja 33 osutatakse seemnete idandamiseks vajalikule valguse (V) ja pimeduse (P) suhtele. Allikates 3, 6, 9, 10, 13 ja 20 osutatakse kasvutingimustele kasvuhoones.
([3]) 0 mm puhul külvatakse seemned mullapinnale või need vajavad idanemiseks valgust.
([4]) Esitatud arv tähistab päevade arvu, mille jooksul idanes viidatud allika kohaselt teatav protsent seemnetest – nt 3 päeva (idanevuse määr 50 %) (allikas 19).
([5]) Küpsemise ja/või stratifitseerimise kestus ei ole alati märgitud. Temperatuuritingimusi ei ole täpsustatud, välja arvatud külmtöötluse puhul, sest kasvuhoones tehtavas katses on temperatuuri reguleerimise võimalused piiratud. Kasvuhoones esinevate tavapäraste temperatuurikõikumiste juures idaneb enamik seemneid.
([6]) On märgitud, kas taimeliigiga tehtud fütotoksilisuse katses vaadeldi herbitsiidi mõju ENNE või PÄRAST tärkamist.
([7]) On esitatud näited seemnete kommertstarnijate kohta.
([8]) On esitatud viited kahe muu kasutatud allika kohta.

▼M6

Osutatud seemnetarnijad

Tarnija tähis	Tarnija andmed
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ, INGLISMAA, +44 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771–3948, USA, (727) 344 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla – Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0, KANADA, (519) 586 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002, USA, (303) 431 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335, USA, (800) 873 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB, INGLISMAA, +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7, KANADA, (800) 274 7333 www.thompson-morgan.com

OSUTATUD KIRJANDUS

(1) Baskin, C. C., ja Baskin, J. M. (1998). Seeds. Academic Press, Toronto.

(2) Blackburn, L. G., ja Boutin, C. (2003). Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). *Ecotoxicology* 12: 271–285.

(3) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T., Batchelor, P. S., ja Maguire, R. J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environ. Toxicol. Chem*. 19: 2532–2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., ja Kjaer, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. *Ecotoxicology* 13: 349–369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., ja Butler, R. (1992). Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. *Ann. Appl. Biol*. 121: 669–677.

(6) Brown, R. A., ja Farmer, D. (1991). Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. Väljaandes: Plants for toxicity assessment, 2. köide. ASTM STP 1115, Gorsuch, J. W., Lower, W. R., Wang, W., ja Lewis, M. A. (toim.), USA Materjalide Katsetamise Ühing, Philadelphia, lk 197–208.

▼M6

(7) Buhler, D. D., ja Hoffman, M. L. (1999). Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, KS.

(8) Clapham, A. R., Tutin, T. G., ja Warburg, E. F. (1981). Excursion flora of the British Isles, 3. väljaanne. Cambridge University Press, Cambridge.

(9) Clay, P. A., ja Griffin, J. L. (2000). Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. *Weed Sci*. 48: 481–486.

(10) Cole, J. F. H., ja Canning, L. (1993). Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds, lk 151–156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds) (2004). Isiklik suhtlus. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J. S., Johnson, F. L., ja McFarlane, J. C. (1990). Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. *Environ. Toxicol. Chem*. 9: 769–776.

(13) Fletcher, J. S., Pfleeger, T. G., Ratsch, H. C., ja Hayes, R. (1996). Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. *Environ. Toxicol. Chem*. 15: 1189–1196.

(14) Flynn, S., Turner, R. M., ja Dickie, J. B. (2004). Seed Information Database (versioon 6.0, oktoober 2004). Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid).

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., ja van der Eerden, L. J. M. (2001). Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environ. Pollut*. 114: 21–28.

(16) Gleason, H. A., ja Cronquist, A. (1991). Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2. väljaane. New York Botanical Garden, Bronx, NY.

(17) Grime, J. P. (1981). The role of seed dormancy in vegetation dynamics. *Ann. Appl. Biol*. 98: 555–558.

(18) Grime, J. P., Mason, G., Curtis, A. V., Rodman, J., Band, S. R., Mowforth, M. A. G., Neal, A. M., ja Shaw, S. (1981). A comparative study of germination characteristics in a local flora. *J. Ecol*. 69: 1017–1059.

(19) Grime, J. P., Hodgson, J. G., ja Hunt, R. (1988). Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London.

(20) Kjaer, C. (1994). Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). *Weed Res*. 34: 453–459.

(21) Klingaman, T. E., King, C. A., ja Oliver, L. R. (1992). Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Sci*. 40: 227–232.

(22) Marrs, R. H., Williams, C. T., Frost, A. J., ja Plant, R. A. (1989). Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environ. Pollut*. 59: 71–86.

(23) Marrs, R. H., Frost, A. J., ja Plant, R. A. (1991). Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environ. Pollut*. 69: 223–235.

(24) Marrs, R. H., Frost, A. J., ja Plant, R. A. (1991). Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. *Environ. Pollut*. 73: 25–42.

(25) Marrs, R. H., Frost, A. J., Plant, R. A., ja Lunnis, P. (1993). Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agr. Ecosyst. Environ*. 45: 283–293.

▼**M6**

(26) Marrs, R. H., ja Frost, A. J. (1997). A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *J. Environ. Manage*. 50: 369–388.

(27) Marshall, E. J. P., ja Bernie, J. E. (1985). Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds, lk 1021–1028.

(28) McKelvey, R. A., Wright, J. P., ja Honegger, J. L. (2002). A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. *Pest Manag. Sci*. 58: 1161–1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed) (2004). Isiklik suhtlus. (http://www.herbiseed.com)

(30) USA põllumajandusministeeriumi loodusvarade kaitse amet (NRCS) (2004). The Plants Database, versioon 3.5 (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490, USA.

(31) USA Keskkonnakaitseamet (1999). One-Liner Database (USA Keskkonnakaitseamet, pestitsiidiprogrammide büroo, keskkonnas säilivuse ja keskkonnamõju talitus, keskkonnaepidemioloogia üksus).

(32) Webster, R. H. (1979). Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L., ja Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada) (2004). Isiklik suhtlus.

(34) Zwerger, P., ja Pestemer, W. (2000). Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. *Z. Pflanzenk. Pflanzen*, Sonderh., 17: 711–718.

▼**M6**

4. liide

Näited teatavate põllumajanduskultuuride jaoks sobivate kasvutingimuste kohta

Allpool esitatud tingimused on leitud olevat sobivad 10 põllumajanduskultuuri jaoks ning neid võib kasutada orientiirina ka kasvukambris teatavate muude liikidega tehtavate katsete puhul.

Süsihappegaasi sisaldus: 350 ± 50 ppm.

Suhteline õhuniiskus: valgel ajal 70 ± 5 % ja pimedal ajal 90 ± 5 %.

Temperatuur: päeval 25 ± 3 °C ja öösel 20 ± 3 °C.

Valgustusperiood: 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust, kui keskmine lainepikkus on vahemikus 400–700 nm.

Valgustustihedus: 350 ± 50 µE m^{-2} s^{-1}, mõõdetuna lehestiku ülapinna tasandil.

Asjaomased põllumajanduskultuurid on järgmised:

— tomat (*Solanum lycopersicon*);

— kurk (*Cucumis sativus*);

— aedsalat (*Lactuca sativa*);

— sojauba (*Glycine max*);

— peakapsas (*Brassica oleracea* var. *capitata*);

— porgand (*Daucus carota*);

— harilik kaer (*Avena sativa*);

— karjamaa-raihein (*Lolium perenne*);

— harilik mais (*Zea mays*);

— harilik sibul (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. VALGELIIMUKLASTE SIGIVUSE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 220 (2004). See meetod on ette nähtud selleks, et hinnata kemikaalide mõju hariliku valgeliimuka (*Enchytraeus albidus* Henle, 1873) sigivusele mullas. Meetod põhineb üldjoontes Saksamaa asutuse Umweltbundesamt välja töötatud meetodil (1), mis on võrdlusuuringuga valideeritud (2). Samuti on kaalutud muid meetodeid kemikaalide mürgisuse hindamiseks valgeliimuklastel ja vihmaussidel (3, 4, 5, 6, 7, 8).

LÄHTEKAALUTLUSED

2. Perekonda *Enchytraeus* kuuluvad mullas elavad rõngussid esindavad ökotoksikoloogiliste katsete jaoks sobivaid ökoloogiliselt olulisi liike. Valgeliimuklasi leidub sageli vihmausse sisaldavas mullas, ent samal ajal esineb neid tihti arvukalt ka paljudes muldades, kus vihmaussid puuduvad. Valgeliimuklasi saab kasutada nii laborikatsetes kui ka poolväli- ja välikatsetes. Praktilisest seisukohast on paljud perekonna *Enchytraeus* liigid hõlpsalt kasutatavad ja kasvatatavad ning nende generatsiooniaeg on oluliselt lühem kui vihmaussidel. Valgeliimuklaste puhul on sigivuskatse kestus üksnes 4–6 nädalat, samas kui vihmausside (*Eisenia fetida*) puhul on see 8 nädalat.

3. Põhiteave maismaakeskkonnas elavate valgeliimuklaste ökoloogia ja nendega seotud ökotoksikoloogia kohta on esitatud allikates 9, 10, 11 ja 12.

KATSE PÕHIMÕTE

4. Täiskasvanud valgeliimukad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on eri kontsentratsioonides segatud kunstliku mullaga. Katse võib jagada kahte etappi: a) kontsentratsioonivahemiku leidmise katse, mis tehakse juhul, kui kättesaadav teave ei ole piisav, ja milles kahenädalase kokkupuuteperioodi järel hinnatav peamine lõppnäitaja on suremus, ning b) lõplik sigivuskatse, milles hinnatakse vanema sigitatud noorloomade koguarvu ja vanemate ellujäämise määra. Lõpliku katse kestus on kuus nädalat. Esimese kolme nädala möödudes eemaldatakse täiskasvanud ussid ja registreeritakse neil esinevad morfoloogilised muutused. Järgmise kolme nädala möödudes loendatakse täiskasvanute moodustatud kookonitest koorunud järglased. Uuritava kemikaaliga kokku puutunud loomade sigivust võrreldakse sigivusega kontrollrühma(de)s, et teha kindlaks: i) täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon ja/või ii) EC_x (nt EC_{10}, EC_{50}), kasutades regressioonimudelit sellise hinnangulise kontsentratsiooni leidmiseks, mille puhul sigivus väheneb x % võrra. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x (nt EC_{10}, EC_{50}) väärtust, nii et EC_x leitakse interpoleerimise, mitte ekstrapoleerimise teel.

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

5. Soovitatavalt peaks olema teada uuritava kemikaali lahustuvus vees, log K_{ow}, jaotuskoefitsient süsteemis muld/vesi (nt käesoleva lisa peatükk C.18 või C.19) ja aururõhk. Samuti on soovitatav lisateabe olemasolu uuritava kemikaali säilivuse kohta mullas, näiteks kemikaali fotolüüsi ja hüdrolüüsi kiirus.

6. Käesolevat katsemeetodit võib kasutada nii vees lahustuvate kui ka vees lahustumatute kemikaalide puhul. Uuritava kemikaaliga töötlemise viis on neil kahel juhul siiski erinev. Katsemeetodit ei saa kasutada lenduvate kemikaalide puhul, mille Henry konstant või jaotuskoefitsient süsteemis õhk/vesi on suurem kui üks, ega kemikaalide puhul, mille aururõhk 25 °C juures on suurem kui 0,0133 Pa.

▼M6

KATSE NÕUETEKOHASUS

7. Katse vastab nõuetele, kui kontrollrühmas on täidetud järgmised kriteeriumid:

— täiskasvanud isendite suremus ei tohiks kontsentratsioonivahemiku leidmise katse lõpus ja sigivuskatse esimese kolme nädala möödudes olla suurem kui 20 %;

— kui katset alustatakse 10 täiskasvanud isendiga nõu kohta, peaks katse lõpuks olema igas nõus sigitatud keskmiselt 25 noorlooma;

— noorloomade keskmise arvu variatsioonikordaja ei tohiks sigivuskatse lõpus olla suurem kui 50 %.

Kui katse ei vasta eespool nimetatud nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleks see lõpetada, välja arvatud juhul, kui katse jätkamist on võimalik põhjendada. Selline põhjendus tuleks esitada katseprotokollis.

VÕRDLUSKEMIKAAL

8. Võrdluskemikaali abil tuleks korrapäraselt või võimaluse korral igas katses kontrollida, kas katseorganismide reaktsioon on aja jooksul üldjoontes samaks jäänud. Sobiv võrdluskemikaal on karbendasiim, mis teadaolevalt mõjutab valgeliimuklaste ellujäämise määra ja sigivust (13, 14); võib kasutada ka muid kemikaale, mille mürgisuse andmed on hästi dokumenteeritud. Võrdlusuuringus kasutati karbendasiimi valmistoote kujul, mida tarnib kaubanime Derosal™ all ettevõte AgrEvo Company (Frankfurt, Saksamaa) ja milles toimeaine sisaldus on 360 g/l (32,18 %) (2). Võrdlusuuringus sigivuse kohta määratud EC_{50} jäi vahemikku 1,2 ± 0,8 mg toimeainet kuivmassi kilogrammi kohta (2). Kui katseseerias kasutatakse positiivse kontrollina mürgist võrdluskemikaali, kasutatakse ühte kontsentratsiooni ning asjaomaste paralleelnõude arv peaks olema sama kui kemikaalita kontrollrühmas. Karbendasiimi puhul soovitatakse teha katse kontsentratsioonil 1,2 mg toimeainet kuivmassi kilogrammi kohta (kui kasutatakse vedelat valmistoodet).

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Seadmed

9. Katsenõud peaksid olema klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Selleks sobivad klaaspurgid (nt mahuga 0,20–0,25 liitrit ja diameetriga umbes 6 cm). Nõudel peaks olema läbipaistev (nt klaasist või polüetüleenist) kaas, mis vähendab vee aurumist ja võimaldab samal ajal gaasivahetust mulla ja atmosfääri vahel. Kaane läbipaistvus on vajalik valguse läbilaskmiseks.

10. On vaja tavapäraseid laboriseadmeid, täpsemalt järgmist:

— kuivatuskapp;

— stereomikroskoop;

— pH-meeter ja fotomeeter;

— sobiv täpne kaal;

— sobivad temperatuuri reguleerimise seadmed;

— sobivad niiskuse reguleerimise seadmed (ei ole hädavajalikud, kui kokkupuutenõu on kaanega);

— inkubaator või väike kliimaseadmega ruum;

— pintsetid, konksud või aasad;

— ilmutusvann.

Kunstliku mulla valmistamine

11. Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse kunstlikku mulda (5, 7), mille koostis on järgmine (kuivmassi põhjal pärast kuumutamist 105 °C juures, kuni mass enam ei muutu):

▼**M6**

— 10 % turbasamblaturvast, mis on õhu käes kuivatatud ja peeneks jahvatatud (osakeste suurus võib olla 2 ± 1 mm); enne katse tegemist soovitatakse kontrollida, kas värskest turbapartiist valmistatud pinnas sobib valgeliimuka kasvatamiseks;

— 20 % kaoliinsavi (soovitatav kaoliniidisisaldus üle 30 %);

— umbes 0,3–1,0 % kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$, pulbristatud, analüütilise puhtusastmega), et saavutada pH väärtus 6,0 ± 0,5; lisatava kaltsiumkarbonaadi kogus võib sõltuda eelkõige turba kvaliteedist ja omadustest;

— umbes 70 % kvartsliiva (sõltuvalt vajalikust $CaCO_3$ kogusest), mis on õhu käes kuivatatud ja koosneb peamiselt peenest liivast, millest üle 50 % moodustavad osakesed suurusega 50–200 mikromeetrit.

Enne kunstliku mulla kasutamist lõplikus katses on soovitatav veenduda selle sobivuses valgeliimuka kasvatamiseks ja katse nõuetekohasuse kriteeriumide saavutamiseks. Sellist kontrollimist soovitatakse eelkõige selleks, et oleks võimalik veenduda, et katsetulemused ei halvene, kui orgaanilise süsiniku sisaldus kunstlikus mullas on väiksem, näiteks kui turbasisaldust vähendatakse 4–5 protsendini ja liivasisaldust vastavalt suurendatakse. Orgaanilise süsiniku sisalduse sellise vähendamise tulemusena võib väheneda mulla (orgaanilise süsiniku) võime uuritavat kemikaali adsorbeerida ning kemikaali saadavus ussidele võib suureneda. On tõendatud, et *Enchytraeus albidus*'e puhul on sigivust käsitlevad nõuetekohasuse kriteeriumid täidetavad, kui katse tehakse põllumullas, milles orgaanilise süsiniku sisaldus on väiksem (näiteks 2,7 %) (15), ning seniste piiratud kogemuste põhjal on võimalik seda saavutada ka kunstlikus mullas, mille turbasisaldus on 5 %.

Märkus: kui tehakse lisakatseid (nt kõrgema tasandi katseid) loodusliku mullaga, tuleks tõendada ka sellise mulla sobivust ja katse nõuetekohasuse kriteeriumide täidetavust.

12. Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (nt suure mahutavusega laborisegistis). Seda tuleks teha vähemalt üks nädal enne katse alustamist. Segatud muld tuleks kaheks päevaks seisma jätta, et happesus stabiliseeruks. Mulla pH mõõtmiseks kasutatakse mulla ja 1 M kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M kaltsiumkloriidi ($CaCl_2$) lahuse segu suhtega 1:5 (vt allikas 16 ja 3. liide). Kui mulla happesus on suurem kui nõutavasse vahemikku jäävad väärtused (vt punkt 11), võib selle reguleerimiseks lisada sobiva koguse $CaCO_3$. Kui muld on liiga leeliseline, võib happesuse suurendamiseks lisada punktis 11 osutatud segu, millest on välja jäetud $CaCO_3$.

13. Kunstliku mulla maksimaalne veemahutavus määratakse vastavalt 2. liites kirjeldatud meetodile. Üks kuni kaks päeva enne katse alustamist eelniisutatakse kuiva kunstlikku mulda piisava koguse deioniseeritud vee lisamise teel, et saavutada veesisaldus, mis on umbes poole väiksem kui lõplik veesisaldus, mis jääb vahemikku 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest. Katse alguses jagatakse eelniisutatud muld nii mitmeks osaks, kui palju on kasutatavatele uuritava kemikaali kontsentratsioonidele vastavaid (ja vajaduse korral võrdluskemikaaliga) katserühmi ja kontrollrühmi. Niiskusesisaldus viiakse 40–60 protsendini maksimaalsest veemahutavusest, lisades

▼M6

uuritava kemikaali lahust ja/või destilleeritud või deioniseeritud vett (vt punktid 19–21). Niiskusesisaldus määratakse katse alguses ja lõpus (kuivatades mulda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu) ning see peaks jääma usside ellujäämiseks optimaalsesse vahemikku. Mulla niiskusesisalduse ligikaudseks kontrollimiseks võib mulda õrnalt peos pigistada: sobiva niiskusesisalduse korral peaksid sõrmede vahele ilmuma väikesed veetilgad.

Katseloomade valimine ja ettevalmistamine

14. Soovitatav katseliik on sugukonda *Enchytraeidae* (alamklass *Oligochaeta*, hõimkond *Annelida*) kuuluv harilik valgeliimukas (*Enchytraeus albidus* Henle, 1837). *E. albidus* on üks suuremaid valgeliimuklaste liike ning selle liigi isendite pikkuseks on mõõdetud kuni 35 mm (17, 18). *E. albidus* on ülemaailmse levikuga liik, keda leidub nii meres, mageveekogudes kui ka maismaa elupaikades, peamiselt lagunevas orgaanilises aines (merevetikad, kompost) ja harva ka niitudel (9). Selle liigi taluvus eri ökoloogiliste tingimuste suhtes ja teatav morfoloogiline varieeruvus võivad osutada eri liigisiseste rühmade olemasolule.

15. *E. albidus* on turul kättesaadav kalasöödana. Tuleks kontrollida, kas kultuur on saastunud muude, tavaliselt väiksemate liikidega (1, 19). Saastumise korral tuleks kõiki usse Petri tassis veega pesta. Seejärel tuleks uue kultuuri loomiseks valida stereomikroskoobi abil välja *E. albidus*'e suured täiskasvanud isendid ja kõik muud ussid kõrvaldada. *E. albidus*'t saab hõlpsalt kasvatada paljudes eri orgaanilistes materjalides (vt 4. liide). *E. albidus*'e elutsükkel on lühike, kuna suguküpsuse saavutamiseks kulub 33 päeva (18 °C juures) kuni 74 päeva (12 °C juures) (1). Katses kasutatakse üksnes kultuure, mida on kasvatatud laboris probleemideta vähemalt 5 nädalat (ühe põlvkonna vältel).

16. Sobivad ka muud perekonna *Enchytraeus* liigid, näiteks *E. buchholzi* (Vejdovský, 1879) või *E. crypticus* (Westheide & Graefe, 1992) (vt 5. liide). Muude perekonna *Enchytraeus* liikide kasutamise korral tuleb selgelt märkida asjaomane liik ja esitada selle valimise põhjendus.

17. Katses kasutatakse täiskasvanud usse. Neil peaksid olema vöö piirkonnas näha munad (valged laigud) ja nad peaksid olema umbes ühesuurused (ligikaudu 1 cm pikkused). Kasvatatava kultuuri sünkroonimine ei ole vajalik.

18. Kui valgeliimuklasi ei kasvatata sama tüüpi mullas ja samades tingimustes (sh söötmistingimused), mida kasutatakse lõplikus katses, tuleb neil lasta kohaneda vähemalt 24 tundi ja kuni kolm päeva. Algselt tuleks lasta kohaneda suuremal arvul täiskasvanud isenditel, kui on vaja katse tegemiseks, et luua varu vigastatud või muul põhjusel sobimatute isendite kõrvaldamiseks. Kohanemisperioodi lõpus valitakse katse jaoks välja üksnes munadega ussid, kelle käitumises ei täheldata kõrvalekaldeid (nt püüdu mullast lahkuda). Ussid eemaldatakse ettevaatlikult juveliiripintsettide, konksu või aasa abil ja viiakse Petri tassi, mis sisaldab väikeses koguses magedat vett. Soovitatakse kasutada käesoleva lisa peatükis C.20 („Hiidkiivriku (*Daphnia magna*) sigivuse katse”) osutatud taastatud magedat vett, kuna deioniseeritud, demineraliseeritud või kraanivesi võib olla ussidele kahjulik. Usse kontrollitakse stereomikroskoobi all ja kõik munadeta ussid kõrvaldatakse. Jälgitakse hoolikalt, et kõik kultuuri nakatada võivad lestad ja hooghännalised saaksid eemaldatud ja kõrvaldatud. Terved ussid, keda katses ei kasutata, viiakse tagasi tüvikultuuri.

▼M6

Katsekontsentratsiooniga segude valmistamine

Vees lahustuv uuritav kemikaal

19. Uuritava kemikaali lahus valmistatakse deioniseeritud vee sellises koguses, millest piisab kõikidele ühe katsekontsentratsiooni puhul kasutatavatele paralleelkultuuridele. Soovitatakse kasutada sobivas koguses vett, et saavutada nõutav niiskusesisaldus, st 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest (vt punkt 13). Enne katsenõusse viimist segatakse uuritava kemikaali iga lahus põhjalikult ühe partii eelniisutatud mullaga.

Vees lahustumatu uuritav kemikaal

20. Vees lahustumatu, kuid orgaanilises lahustis lahustuva kemikaali võib lahustada võimalikult väikeses koguses sobivas kandeaines (nt atsetoonis). Tuleks kasutada üksnes lenduvaid lahusteid. Kandeaine pihustatakse väikesele kogusele, näiteks 2,5 grammile peenele kvartsliivale või segatakse sellega. Kandeaine kõrvaldatakse vähemalt üks tund kestva tõmbekapis aurustamise teel. Kvartsliiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelniisutatud mullale ja pärast nõutava niiskusesisalduse saavutamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist segatakse saadav segu põhjalikult läbi. Lõplik segu viiakse katsenõudesse.

21. Vees ja orgaanilistes lahustites raskesti lahustuva kemikaali puhul segatakse soovitava katsekontsentratsiooni saavutamiseks vajalik kogus uuritavat kemikaali sellise koguse peeneks jahvatatud kvartsliivaga, mis vastab 2,5 grammile katsenõu kohta. Kõnealune kvartsliiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelniisutatud mullale ja pärast nõutava niiskusesisalduse saavutamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist segatakse saadav segu põhjalikult läbi. Lõplik segu jaotatakse katsenõudesse. Kirjeldatud toiminguid korratakse iga katsekontsentratsiooni puhul ning valmistatakse ka sobiv kontrollsegu.

22. Kemikaale ei tohiks üldjuhul testida suuremal kontsentratsioonil kui 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Mõne konkreetse katse eesmärkide saavutamiseks võib suurema kontsentratsiooni kasutamine siiski vajalik olla.

KATSE KÄIK

Katse- ja kontrollrühmad

23. Iga katses kasutatava kontsentratsiooni puhul viiakse katsenõusse 20 grammile kuivmassile vastav kogus katsemulda (vt punktid 19–21). Valmistatakse ka uuritava kemikaalita kontrollsegud. Igasse nõusse lisatakse sööt punktis 29 kirjeldatud viisil. Igasse katsenõusse viiakse juhuvaliku alusel 10 ussi. Ussid pannakse näiteks juveliiripintsette, konksu või aasa kasutades ettevaatlikult igasse katsenõusse mullapinnale. Paralleelnõude arv iga katses kasutatava kontsentratsiooni puhul ja kontrollrühmades sõltub kasutatavast katseplaanist (vt punkt 34). Katsenõud paigutatakse inkubaatorisse juhuslikult ja nende paigutust muudetakse juhuslikkuse alusel igal nädalal.

24. Kui uuritava kemikaaliga töötlemiseks kasutatakse kandeainet, tuleks moodustada lisaks katserühmadele üks kontrollrühm, kus kasutatakse kvartsliiva, millega on segatud või millele on pihustatud lahustit. Asjaomase lahusti või dispergeeriva aine kontsentratsioon peaks olema sama kui uuritavat kemikaali sisaldavates katsenõudes. Kemikaalide puhul, millega töötlemisel on vaja järgida punktis 21 kirjeldatud korda, tuleks moodustada kontrollrühm, kus kasutatakse täiendavalt kvartsliiva (2,5 g nõu kohta).

▼M6

Katsetingimused

25. Katsetemperatuur on 20 ± 2 °C. Et hoida ära usside põgenemist mullast, kasutatakse katses kontrollitavat valgustusrežiimi (soovitatavalt 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust) ja katsenõude inkubeerimisalal valgustustihedus 400–800 luksi.

26. Mulla niiskusesisalduse kontrollimiseks kaalutakse katsenõusid katse alguses ja seejärel kord nädalas. Kaalu vähenemist kompenseeritakse sobiva koguse deioniseeritud vee lisamisega. Tuleks tähele panna, et veekadu on võimalik vähendada, hoides inkubaatoris kõrget õhuniiskuse taset (> 80 %).

27. Niiskusesisaldust ja pH-d tuleks mõõta nii kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kui ka lõpliku katse alguses ja lõpus. Mõõtmiste tegemiseks tuleks kasutada kemikaaliga igal kontsentratsioonil töödeldud mullaproove ja kontrollproove, mis on valmistatud ja mida inkubeeritakse samal viisil kui katsekultuure, kuid mis ei sisalda usse. Nendesse mullaproovidesse tuleks sööta lisada üksnes katse alguses, et soodustada mikroobide elutegevust. Lisatava sööda kogus peaks olema sama kui katsekultuuridesse lisatav kogus. Nendesse nõudesse ei ole vaja katse vältel enam sööta juurde lisada.

Söötmine

28. Võib kasutada sööta, mille puhul on tagatud valgeliimuklaste populatsiooni säilimine. On kindlaks tehtud, et söödamaterjalina on sobiv kasutada valtsitud kaera, mis on soovitatav mikroobidega saastumise ärahoidmiseks enne kasutamist autoklaavida (sobib ka kuumutamine).

29. Sööda esmakordseks lisamiseks segatakse 50 mg jahvatatud valtsitud kaera igas nõus mullaga enne usside lisamist. Seejärel lisatakse sööta igal nädalal kuni 21. katsepäevani. Sööta ei lisata 28. katsepäeval, kuna selleks ajaks on täiskasvanud ussid juba eemaldatud ja noored ussid vajavad pärast seda suhteliselt vähe lisatoitu. Katse ajal lisatakse söödana 25 mg jahvatatud valtsitud kaera nõu kohta, pannes need ettevaatlikult mullapinnale, et usse mitte vigastada. Seente kasvu pärssimiseks tuleks kaerahelbed mulla sisse viia, kattes need väikese koguse mullaga. Kui sööt jäetakse söömata, tuleks söödakogust vähendada.

Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse plaan

30. Vajaduse korral tehakse kontsentratsioonivahemiku leidmise katse, milles kasutatakse näiteks viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni: 0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Iga katserühma ja kontrollrühma puhul piisab ühest nõust.

31. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kestus on kaks nädalat. Katse lõpus hinnatakse usside suremust. Uss loetakse surnuks, kui ta ei reageeri esiotsa mehaanilisele ärritamisele. Lõplikus katses kasutamiseks sobiva kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramiseks võib olla kasu ka muust teabest peale suremuse. Seepärast tuleks registreerida ka muutused täiskasvanud isendite käitumises (nt võimetus mulda kaevuda või katsenõu klaasseina vastas liikumatult lamamine) ja morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine), samuti noorloomade esinemine. Viimaste kindlakstegemiseks võib kasutada 6. liites kirjeldatud värvimismeetodit.

32. LC_{50} ligikaudseks määramiseks võib arvutada suremuse määra geomeetrilise keskväärtuse. Lõplikus katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramisel eeldatakse, et mõju sigivusele avaldub kuni 10 korda väiksemal kontsentratsioonil kui LC_{50}. See suhe on siiski katseliselt leitud ja

▼M6

võib igal konkreetsel juhul olla erinev. Lõplikus katses kasutatavat uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku võivad aidata kindlaks määrata ka muud kontsentratsioonivahemiku leidmise katses tehtud tähelepanekud, näiteks noorloomade esinemine.

33. LC_{50} täpseks määramiseks soovitatakse kasutada katses vähemalt nelja paralleelnõu uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni kohta ja piisavat arvu eri kontsentratsioone, et saada vähemalt neli statistiliselt oluliselt erinevat vastuse keskväärtust. Vajaduse korral kasutatakse kontrollrühmade puhul sarnast arvu kontsentratsioone ja paralleelnõusid.

Lõpliku sigivuskatse plaan

34. Võrdlusuuringu (2) alusel välja töötatud soovitustest lähtuvalt pakutakse välja kolm katseplaani.

— Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramiseks tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 1,8.

— EC_x (nt EC_{10}, EC_{50}) määramiseks tuleks katses kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x väärtust, et võimaldada määrata EC_x interpoleerimise, mitte ekstrapoleerimise teel. Soovitatakse kasutada vähemalt nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja nelja paralleelnõu kontrollrühmas. Kontsentratsioonide jada tegur võib varieeruda, st olla eeldatavas mõju avaldumise vahemikus 1,8 või väiksem ning sellest vahemikust väljaspool olevate suuremate ja väiksemate kontsentratsioonide puhul üle 1,8.

— Kombineeritud lähenemisviis võimaldab määrata nii täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni kui ka EC_x. Tuleks kasutada kaheksat uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 1,8.

35. Tuleks kasutada 10 täiskasvanud ussi katsenõu kohta (vt punkt 23). Sööta lisatakse katsenõudesse katse alguses ja seejärel kord nädalas (vt punkt 29) kuni 21. katsepäeva lõpuni. Kahekümne esimesel katsepäeval vaadatakse mullaproovid käsitsi hoolikalt läbi ning elusad täiskasvanud ussid loendatakse, neid vaadeldakse ja registreeritakse muutused nende käitumises (nt võimetus mulda kaevuda või katsenõu klaasseina vastas liikumatult lamamine) ja morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine). Seejärel eemaldatakse kõik täiskasvanud ussid katsenõudest ja katsemullast. Katsemulda koos kõikide selles sisalduvate moodustatud kookonitega inkubeeritakse veel kolm nädalat samades katsetingimustes; ainsa erinevusena lisatakse sööta (st 25 mg jahvatatud valtsitud kaera nõu kohta) üksnes 35. katsepäeval.

36. Kuue nädala möödudes loendatakse katse vältel koorunud ussid. Soovitatakse kasutada bengali punasega värvimisel põhinevat meetodit (vt 6. liide), kuid sobivaks on osutunud ka muud vedelikuga (kuid mitte kuumusega) ekstraheerimise ja vedelikupinnale toomise meetodid (vt 6. liide) (4, 10, 11, 20). Bengali punasega värvimist soovitatakse kasutada seepärast, et mullasubstraadist vedelikuga ekstraheerimise puhul võib segavaks teguriks olla suspendeeritud saviosakeste põhjustatud hägusus.

Piirsisalduskatse

37. Kui kontsentratsioonivahemiku leidmise katses ei täheldata suurimal kasutatud kontsentratsioonil (nt kontsentratsioonil 1 000 mg/kg) mingit mõju, võib sigivuskatse teha piirsisalduskatsena, kasutades kontsentratsiooni 1 000 mg/kg, et tõendada, et täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon on sigivuse puhul sellest väärtusest suurem.

▼M6

Katse lühikirjeldus ja ajakava

38. Katse etapid võib kokku võtta järgmiselt.

Aeg	Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse	Lõplik katse
7 päeva enne katset või varem	— Valmistatakse kunstlik muld (segatakse kokku kuivad koostisosad)	— Valmistatakse kunstlik muld (segatakse kokku kuivad koostisosad)
5 päeva enne katset	— Kontrollitakse kunstliku mulla pH-d — Mõõdetakse mulla maksimaalne veemahutavus	— Kontrollitakse kunstliku mulla pH-d — Mõõdetakse mulla maksimaalne veemahutavus
5 kuni 3 päeva enne katset	— Valitakse välja ussid katsetingimustega kohandamiseks	— Valitakse välja ussid katsetingimustega kohandamiseks
3 kuni 0 päeva enne katset	— Ussidel lastakse vähemalt 24 tundi kohaneda	— Ussidel lastakse vähemalt 24 tundi kohaneda
1 päev enne katset	— Kunstlik muld eelniisutatakse ja jagatakse partiideks	— Kunstlik muld eelniisutatakse ja jagatakse partiideks
Katse alustamise päev (0-päev)	— Valmistatakse põhilahused — Töödeldakse uuritava kemikaaliga — Kaalutud kogus katsesubstraati viiakse katsenõudesse — Lisatakse sööt — Lisatakse ussid — Mõõdetakse mulla pH ja niiskusesisaldus	— Valmistatakse põhilahused — Töödeldakse uuritava kemikaaliga — Kaalutud kogus katsesubstraati viiakse katsenõudesse — Lisatakse sööt — Lisatakse ussid — Mõõdetakse mulla pH ja niiskusesisaldus
7. päev	— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust	— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Lisatakse sööta
14. päev	— Määratakse täiskasvanud usside suremus — Määratakse noorloomade hinnanguline arv — Mõõdetakse mulla pH ja niiskusesisaldus	— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Lisatakse sööta
21. päev		— Jälgitakse täiskasvanud usside käitumist — Eemaldatakse täiskasvanud ussid — Määratakse täiskasvanud usside suremus — Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Lisatakse sööta
28. päev		— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Sööta ei lisata
35. päev		— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Lisatakse sööta
42. päev		— Loendatakse noorloomad — Mõõdetakse mulla pH ja niiskusesisaldus

▼M6

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

39. Käesolevas katsemeetodis ei anta lõplikke juhiseid katsetulemuste statistilise analüüsi kohta; 7. liites on siiski esitatud asjakohane ülevaade.

40. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses on peamine lõppnäitaja suremus. Siiski tuleks registreerida ka muutused täiskasvanud isendite käitumises (nt võimetus mulda kaevuda või katsenõu klaasseina vastas liikumatult lamamine) ja morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine), samuti noorloomade esinemine. Üldjuhul tuleks kasutada LC_{50} leidmiseks probitanalüüsi (21) või logistilist regressiooni. Selle analüüsimeetodi sobimatuse korral (nt kui andmed hõlmavad vähem kui kolme kontsentratsiooni, mille puhul täheldatakse osalist suremust) võib kasutada mõnda alternatiivset meetodit. Kõnealuse meetodina võib muu hulgas kasutada libiseva keskmise meetodit (22), kohandatud Spearmani-Kärberi meetodit (23) või lihtsat interpoleerimist (nt LC_0 ja LC_{100} geomeetrilist keskmist, mis on saadud LC_0 ja LC_{100} korrutisest ruutjuure võtmise teel).

41. Lõplikus katses on lõppnäitaja sigivus (st sigitatud noorloomade arv). Sarnaselt kontsentratsioonivahemiku leidmise katsele tuleks lõpp-protokolli siiski märkida ka kõik muud kahjuliku mõju ilmingud. Statistilise analüüsi käigus on vaja arvutada sigivuse aritmeetiline keskmine ja standardhälve igas katse- ja kontrollrühmas.

42. Dispersioonanalüüsi tegemise korral võib standardhälbe s ja selle vabadusastmete arvu df asendada vastavalt dispersioonianalüüsi (ANOVA) tulemusena leitud hajuvuse hinnangulise koondmäära ja selle vabadusastmete arvuga, eeldusel, et hajuvus ei sõltu kontsentratsioonist. Sellisel juhul kasutatakse kontroll- ja katserühmade puhul ühte hajuvuse väärtust. Kõnealused väärtused arvutatakse tavaliselt müügiloleva statistilise analüüsi programmi abil, kasutades paralleelidena igas eraldi nõus saadud tulemusi. Kui ilmneb, et negatiivse kontrolli ja lahustiga kontrolli andmete koondamine on mõistlikum kui võrdlemine ühe nimetatud kontrolliga, tuleks veenduda, et asjaomased andmed ei ole oluliselt erinevad (selleks sobivatele meetoditele osutatakse punktis 45 ja 7. liites).

43. Edasine statistiline analüüs ja järeldused sõltuvad sellest, kas paralleelnõudes saadud väärtused on normaaljaotusega ja kas nende hajuvus on homogeenne.

Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) hindamine

44. Soovitatavalt tuleks kasutada suure võimsusega meetodit. Et hinnata andmete jaotuse ligikaudset vastavust normaaljaotusele, tuleks kasutada varasemal kogemusel, näiteks võrdlusuuringu andmetel või muudel varasematel andmetel põhinevat teavet. Hajuvuse homogeensus (homoskedastiivsus) on suurema tähtsusega. Kogemusest nähtub, et hajuvus suureneb sageli keskväärtuse suurenedes. Sellisel juhul võib homoskedastiivsuse saavutamiseks olla kasu andmete teisendamisest. Kõnealuse teisendamise puhul tuleks siiski lähtuda varasematel andmetel põhinevast kogemusest, mitte analüüsitavatest andmetest. Homogeensete andmete puhul tuleks kasutada mitmest t-testi, näiteks Williamsi testi ($\alpha = 0{,}05$; ühepoolne) (24, 25) või teatavatel juhtudel Dunnetti testi (26, 27). Tuleks tähele panna, et paralleelnõude andmete ebavõrdse hajuvuse korral tuleb tabelis esitatud t-väärtusi Dunnetti ja Williamsi kirjeldatud viisil korrigeerida. Mõnikord ei suurene/-vähene saadud väärtused suurest varieeruvusest tingituna korrapäraselt. Sellise suure monotoonsusest kõrvalekaldumise puhul on asjakohasem kasutada Dunnetti testi. Homoskedastiivsusest kõrvalekaldumise puhul võib olla mõistlik hinnata võimalikku mõju hajuvusele lähemalt, et oleks võimalik

▼M6

otsustada, kas asjaomaseid t-teste saab kasutada võimsust oluliselt kaotamata (28). Teise võimalusena võib kasutada mitmest U-testi, näiteks Bonferroni U-testi vastavalt Holmile (29), või heteroskedastiivsete andmete puhul, mis muidu vastavad üldisele monotoonsele kontsentratsioonist sõltuvusele, mõnda muud mitteparameetrilist (nt Jonckheere'i-Terpstra (30, 31) või Shirley (32, 33)) testi; sellist testi tuleks üldjuhul eelistada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testile (vt ka skeem, 7. liide).

45. Kui on tehtud piirsisalduskatse ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeensus) on täidetud, võib kasutada paariviisilist Studenti t-testi või ka Manni-Whitney U-testi (29).

EC_x leidmine

46. Mis tahes EC_x väärtuse arvutamiseks regressioonanalüüsi (lineaarse või mittelineaarse regressiooni) teel kasutatakse katserühmade andmete keskväärtusi, mille alusel leitakse kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust kirjeldav sobiv funktsioon. Pideva tunnusena vaadeldava usside kasvu puhul võib EC_x väärtuste leidmiseks kasutada sobivat regressioonanalüüsi (35). Binaarsete andmete (suremus/elulemus) ja sigitatud järglaste arvu puhul sobivad funktsioonid on muu hulgas normaaljaotuse sigmoidfunktsioon, logistiline funktsioon ja Weibulli funktsioon, mis hõlmavad kahte kuni nelja parameetrit ja millest mõni sobib ka hormeetilise mõju modelleerimiseks. Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust väljendava funktsiooni leidmiseks kasutatakse lineaarset regressiooni, tuleks enne EC_x määramist veenduda regressioonanalüüsi teel r^2 (määratusekordaja) ja/või tõusu väärtuse olulisuses; EC_x arvutamiseks sisestatakse regressioonanalüüsi tulemusena saadud võrrandisse väärtus, mis vastab x protsendile kontrollrühma keskväärtusest. Usalduspiirid usaldusnivool 95 % arvutatakse vastavalt Fiellerile (viidanud Finney (21)) või mõne muu sobiva kaasaegse meetodi abil.

47. Teise võimalusena väljendatakse mõju protsentuaalse või lihtosakaaluna mudeli parameetrina käsitatavast kontrollrühma näitaja keskväärtusest. Sellisel juhul on normaaljaotusele vastava (logistilise, Weibulli) sigmoidse kõvera lähendamiseks andmetele sageli võimalik hõlpsalt kasutada probitanalüüsil põhinevat regressioonimeetodit (21). Kõnealusel juhul tuleb kaalufunktsiooni kohandada arvulise tunnuse analüüsimiseks, nagu on kirjeldanud Christensen (36). Hormeesi ilmnemisel tuleks probitanalüüsi asemel siiski rakendada neljaparameetrilist logistilist või Weibulli funktsiooni, kasutades lähendamiseks mittelineaarset regressiooni (36). Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust väljendava sobiva funktsiooni lähendamine andmetele ei ole võimalik, võib EC_x hinnangulise väärtuse ja asjaomaste usalduspiiride määramiseks kasutada muud meetodit, näiteks libiseva keskmise meetodit vastavalt Thompsonile (22) või kohandatud Spearmani-Kärberi meetodit (23).

KATSEPROTOKOLL

48. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline iseloomustus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (nt lahustuvus vees, aururõhk);

— uuritava kemikaali identifitseerimisandmed vastavalt IUPACi nomenklatuurile, kemikaali CASi number, partii, struktuurivalem ja puhtus;

— proovi kõlblikkusaja lõppkuupäev.

Katseliik:

— kasutatud katseloomad: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused.

Katsetingimused:

— kunstliku mulla koostisosad ja valmistamine;

▼M6

— uuritava kemikaaliga töötlemise meetod;

— katsetingimuste kirjeldus, sealhulgas temperatuur, niiskusesisaldus, pH jne;

— katseplaani ja katse läbiviimise täielik kirjeldus.

Katsetulemused:

— täiskasvanud usside suremus kaks nädalat pärast kontsentratsioonivahemiku leidmise katse alustamist ja noorloomade arv katse lõpus;

— täiskasvanud usside suremus kolm nädalat pärast lõpliku katse alustamist ja täielikud andmed noorloomade kohta katse lõpus;

— katseorganismidel täheldatavad mis tahes füüsilised või patoloogilised sümptomid ja käitumuslikud muutused;

— vastavalt vajadusele LC_{50}, sigivuse puhul määratud täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon ja/või EC_x (nt EC_{50}, EC_{10}) koos usaldusvahemikuga ning graafik asjaomase näitaja arvutamiseks kasutatud lähendatud kõveraga, samuti kõik tulemuste tõlgendamist hõlbustavad andmed ja tähelepanekud.

Kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse ajal täheldatavad ebatavalised ilmingud.

KIRJANDUS

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J., ja Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 lk.

(3) Westheide, W., ja Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results. Väljaandes: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Toim. Esser, G., ja Overdieck, D., lk 497–508. Elsevier, Amsterdam.

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R., ja Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 lk.

(5) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.

(6) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No. 11268-1. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(7) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(8) Rundgren, S., ja Augustsson, A. K. (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovský, 1877). Väljaandes: Løkke, H., ja Van Gestel, C. A. M., Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, lk 73–94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217–232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox*. 7: 246–249.

(11) Dunger, W., ja Fiedler, H. J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼**M6**

(12) Didden, W. A. M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2–29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox*. 3: 19–24.

(14) Römbke, J., ja Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests. Newsletter on Enchytraeidae No. 4, lk 79–96.

(15) Römbke, J., Riepert, F., ja Achazi, R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen. Väljaandes: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W., ja Eisentraeger, A. (toim.). Spektrum Verl., Heidelberg. Lk 59–81.

(16) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(17) Bell, A. W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, lk 1–13.

(18) Nielsen, C. O., ja Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8–9, lk 1–160.

(19) Bouguenec, V., ja Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. *Ann. Limnol*. 23: 9–22.

(20) Korinkova, J., ja Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting. Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, lk 300–305.

(21) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis (3. väljaanne), lk 19–76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M. A., Russo, R. C., ja Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol*. 11: 714–719; parandus: *Environ. Sci. Technol*. 12 (1978): 417.

(24) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.

(25) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519–531.

(26) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc*. 50: 1096–1121.

(27) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.

(28) van der Hoeven, N. (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355–361.

(29) Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat*. 6: 65–70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika* 41: 133–145.

(31) Terpstra, T. J. (1952). The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking. *Indagat. Math*. 14: 327–333.

(32) Shirley, E. A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies. *Appl. Stat*. 28: 144–151.

▼**M6**

(33) Williams, D. A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control. *Biometrics* 42: 183–186.

(34) Sokal, R. R., ja Rohlf, F. J. (1981). Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 2. väljaanne. W. H. Freeman and Company, New York.

(35) Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Res*. 18: 213–221.

(36) Van Ewijk, P. H., ja Hoekstra, J. A. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox. Environ. Safe*. 25: 25–32.

▼M6

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Kemikaal – aine või segu.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

LC_0 (kontsentratsioon, mille puhul surmav mõju puudub) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal ei surma teatava aja jooksul ühtki kemikaaliga kokku puutunud katseorganismi. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

LC_{50} (kontsentratsioon, mille puhul sureb pool katseorganismidest) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal surmab teatava aja jooksul 50 % kemikaaliga kokku puutunud katseorganismidest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC_{50} uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

LC_{100} (kontsentratsioon, mille puhul surevad kõik katseorganismid) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal surmab teatava aja jooksul 100 % kemikaaliga kokku puutunud katseorganismidest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC_{100} uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) – uuritava kemikaali väikseim kontsentratsioon, mille juures täheldatakse statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta. Kõikidel sellisest kontsentratsioonist suurematel katsekontsentratsioonidel peaks üldjuhul täheldatama kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist mõju. Kõnealuse kontsentratsiooni määramisega seotud mis tahes kõrvalekaldeid eespool esitatud määratlusest tuleb katseprotokollis põhjendada.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähimat täheldatavat toimet avaldavat kontsentratsiooni. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

Sigivuse määr – katseperioodi jooksul sigitatud noorloomade keskmine arv teatava arvu täiskasvanud usside kohta.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M6

2. liide

Maksimaalse veemahutavuse määramine

Kunstliku mulla veemahutavuse määramine

On leitud, et veemahutavuse määramiseks sobib järgmine meetod. Seda kirjeldatakse standardi ISO/DIS 11268-2 C lisas.

Sobiva seadme (puuriga toru vmt) abil kogutakse kindlaksmääratud kogus (nt 5 g) katsemulda. Toru alumine ots kaetakse filterpaberi tükiga ja pärast veega täitmist pannakse toru resti peale veevanni. Toru tuleks vette lasta vähehaaval, kuni veetase on mullapinnast kõrgemal. Seejärel tuleks toru umbes kolmeks tunniks vette jätta. Kuna muld ei suuda hoida kogu kapillaaridesse absorbeerunud vett, tuleks mullaproovil lasta kahe tunni vältel nõrguda, asetades toru väga märja peeneks jahvatatud kvartsliiva kihile, mis paikneb kuivamise ärahoidmiseks suletud nõus. Seejärel tuleks proov kaaluda ning kuivatada seda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu. Veemahutavuse saab seejärel arvutada järgmise valemiga:

$$\text{Veemahutavus (protsentides kuivmassist)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100,$$

kus:

S on veega küllastunud substraadi mass + toru mass + filterpaberi mass;

T on tühimass (toru mass + filterpaberi mass);

D on substraadi kuivmass.

VIIDE

Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

▼**M6**

3. liide

Mulla pH määramine

Allpool kirjeldatud meetod mullaproovi pH määramiseks põhineb standardis ISO 10390 („Soil Quality – Determination of pH") esitatud kirjeldusel.

Kindlaksmääratud mullakogusel lastakse toatemperatuuril vähemalt 12 tundi kuivada. Seejärel valmistatakse vähemalt 5 grammi mulda sisaldav suspensioon, kasutades 1 M analüütilise puhtusastmega kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M analüütilise puhtusastmega kaltsiumkloriidi ($CaCl_2$) lahust, mille maht on mulla mahust viis korda suurem. Suspensiooni loksutatakse põhjalikult viis minutit. Pärast loksutamist lastakse suspensioonil settida vähemalt kaks tundi, kuid mitte kauem kui 24 tundi. Seejärel mõõdetakse vedela faasi pH väärtus pH-meetriga, mis kaliibritakse enne iga mõõtmist sobiva rea puhverlahustega (nt pH väärtustel 4,0 ja 7,0).

VIIDE

Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

▼**M6**

4. liide

Perekonna *Enchytraeus* liikide kultiveerimistingimused

Liigi *Enchytraeus albidus* (ja muude perekonna *Enchytraeus* liikide) valgeliimukaid võib kasvatada suurtes plastkarpides (nt mõõtmetega 30 × 60 × 10 cm), mis on täidetud mullaseguga, milles kunstliku mulla ja loodusliku saastumata aiamulla vahekord on 1:1. Tuleks hoiduda komposti kasutamisest, kuna see võib sisaldada mürgiseid kemikaale, näiteks raskmetalle. Enne mulla kasutamist tuleks sellest eemaldada fauna (nt sügavkülmutamise teel). Võib kasutada ka üksnes kunstlikust mullast koosnevat substraati, kuid sel juhul võib sigivuse määr olla väiksem kui segatud mullasubstraadi puhul. Kultiveerimiseks kasutatava substraadi pH peaks olema 6,0 ± 0,5.

Kultuuri hoitakse pimedas temperatuuril 15 kuni 20 °C ± 2 °C. Tuleks hoiduda kasutamast kõrgemat temperatuuri kui 23 °C. Mulda tuleks hoida niiskena, kuid see ei tohiks olla märg. Muld on sobiva niiskusesisaldusega, kui mulda õrnalt peos pigistades ilmuvad sõrmede vahele väikesed veetilgad. Hapnikuvaeguse ärahoidmiseks tuleb tagada, et kultiveerimisnõu kaas võimaldaks piisavat gaasivahetust atmosfääriga. Mulda tuleks aereerituse tagamiseks igal nädalal hoolikalt kobestada.

Usse võib sööta valtsitud kaeraga. Kaera tuleks hoida suletud nõudes ning enne kasutamist tuleks seda autoklaavida või kuumutada, et takistada saastumist aidalestadega (näiteks *Glycyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) või röövlestadega (näiteks *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Pärast kuumtöötlust tuleks sööt jahvatada, et seda oleks lihtne mullapinnale puistata. Aeg-ajalt võib peale valtsitud kaera lisada ka vitamiine, piima ja tursamaksaõli. Muu sobiv sööt on pagaripärm ja kalasööt TetraMin.

Usse söödetakse umbes kaks korda nädalas. Sobiv kogus valtsitud kaera puistatakse mullapinnale või segatakse ettevaatlikult substraadiga mulla aereerituse tagamiseks tehtava kobestamise käigus. Lisatava sööda absoluutkogus sõltub substraadis olevate usside arvust. Üldiselt tuleks söödakogust suurendada, kui kogu lisatav sööt tarbitakse ära ühe ööpäeva jooksul. Kui aga järgmise söötmise ajal (üks nädal hiljem) on mullapinnal veel sööta alles, tuleks söödakogust vähendada. Seentega saastunud sööt tuleks kõrvaldada ja uuega asendada. Kolme kuu möödudes tuleks ussid viia üle värskelt valmistatud substraati.

Kultiveerimistingimused loetakse rahuldavaks, kui: a) ussid ei püüa mullasubstraadist lahkuda, b) nad liiguvad mullas kiiresti, c) nende nahapind on läikiv ja sellele ei kleepu mullaosakesed, d) nad on enam-vähem valkja värvusega, e) neid leidub kultuurides mitmes eri vanuserühmas ning f) nad sigivad pidevalt.

▼M6

5. liide

Katse käik muude perekonna *Enchytraeus* liikide puhul

Liigi valimine

E. albidus'e asemel võib kasutada mõnda muud liiki, kuid sel juhul tuleks katse käiku ja nõuetekohasuse kriteeriume vastavalt kohandada. Kuna paljud perekonna *Enchytraeus* liigid on hõlpsalt kättesaadavad ja neid on võimalik laboris rahuldavalt kasvatada, siis on *E. albidus*'e asemel mõne muu liigi valimisel kõige olulisem kriteerium ökoloogiline olulisus ja lisaks sellele ka võrreldav tundlikkus. Katses kasutatava liigi muutmisel võivad olla ka ametlikud põhjused. Näiteks on riikides, kus *E. albidus*'t ei esine ja kuhu seda ei saa importida (nt karantiiniga seotud piirangute tõttu), vaja kasutada mõnda muud perekonna *Enchytraeus* liiki.

Sobivate alternatiivsete liikide näited

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992): seda liiki on viimastel aastatel ökotoksikoloogilistes uuringutes sageli kasutatud, kuna selle esindajaid on lihtne kasvatada ja katsetes kasutada. Selle liigi ussid on siiski väikesed ja seepärast on nende käitlemine *E. albidus*'ega võrreldes keerukam (eriti värvimismeetodi kasutamisele eelnevates etappides). *E. crypticus*'e leidumist looduses ei ole veel kindlalt tuvastatud, seda on kirjeldatud üksnes vihmausside kultuurides. Seega ei ole liigi ökoloogilised vajadused teada.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovský, 1879): selle nimetusega tähistatakse tõenäoliselt rühma lähedasi liike, kelle morfoloogiline eristamine on raske. Selle rühma esindajaid ei soovitata katsetes kasutada enne, kui kasutatavaid isendeid on võimalik määrata liigi tasandil. *E. buchholzi*'t esineb tavaliselt niitudel ja häiritud kooslusega aladel, näiteks teepervedel.

— *Enchytraeus luxuriosus*: see liik oli algselt tuntud kui *E. minutus*, kuid seda on kirjeldatud alles hiljuti (1). Esmakordselt leidis selle liigi esindajaid U. Graefe (Hamburg) ühelt St. Peter-Ordingi (Schleswig-Holstein, Saksamaa) lähedal asuvalt niidult. *E. luxuriosus* on umbes poole väiksem kui *E. albidus*, kuid suurem kui muud siin kirjeldatud liigid; sel põhjusel võib sellest kujuneda hea alternatiiv *E. albidus*'ele.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen, 1963): siiani on teatatud selle liigi esinemisest Saksamaa ja Hispaania mineraalmuldades, kus see on levinud, kuid tavaliselt mitte väga arvukas. Selle perekonna teiste väikeste liikidega võrreldes on *E. bulbosus* suhteliselt hõlpsalt määratav. Selle liigi käitumise kohta laborikatsetes ja tundlikkuse kohta kemikaalide suhtes andmed puuduvad. On siiski leitud, et seda liiki on kerge kultiveerida (E. Belotti, isiklik suhtlus).

Kasvatustingimused

Perekonna *Enchytraeus* kõiki eespool nimetatud liike saab kultiveerida samades substraatides, mida kasutatakse *E. albidus*'e puhul. Kuna kõnealused liigid on väiksemad, võib kasutada väiksemaid kultiveerimisnõusid, ning ehkki kasutatav sööt võib olla sama, tuleb sööda kogust kohandada. Nende liikide elutsükkel on lühem kui *E. albidus*'el ja sööta tuleks lisada sagedamini.

Katsetingimused

Katsetingimused on üldiselt samad kui *E. albidus*'e puhul, välja arvatud järgmised aspektid:

— katsenõud võivad (kuid ei pruugi) olla väiksemad;

— sigivuskatse kestus võib (kuid ei pruugi) olla lühem, st kuue nädala asemel neli nädalat; kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kestust ei tohiks aga muuta;

— noorloomade väiksusest tulenevalt soovitatakse tungivalt kasutada loendamiseks värvimismeetodit;

— katse nõuetekohasuse kriteeriumi, milles käsitletakse kontrollrühmas täheldatavat noorloomade arvu katsenõu kohta, tuleks muuta nii, et kõnealune nõutav arv oleks 50.

▼**M6**

VIIDE

(1) Schmelz, R. M., ja Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93–100.

▼M6

6. liide

Ekstraheerimismeetodite üksikasjalik kirjeldus

Bengali punasega värvimine

See meetod töötati algselt välja limnoloogias (1) ja ettepaneku selle kasutuselevõtuks valgeliimuka noorloomade loendamiseks valgeliimuklaste sigivuse katses tegi esmakordselt W. de Coen (Ghenti Ülikool, Belgia). Sellest sõltumatult töötati Bilthovenis asuvas Hollandi Riiklikus Rahvatervise ja Keskkonnainstituudis (RIVM) välja meetodi modifikatsioon (bengali punase segamine formaldehüüdiga etanooli asemel) (2, 3).

Lõpliku katse lõpus (st kuue nädala möödudes) viiakse katsenõus olev muld madalasse nõusse. Selleks sobib Bellaplasti nõu või ribilise põhjaga ilmutusvann – viimane seepärast, et ribid piiravad usside liikumist vaateväljas. Noorloomad fikseeritakse etanooliga (umbes 5 ml paralleelnõu kohta). Seejärel lisatakse nõudesse vett, et tekiks 1–2 cm sügavune veekiht. Lisatakse paar tilka (200–300 µl) bengali punast (1 % lahus etanoolis) (võib kasutada ka 0,5 % eosiini) ja segatakse hoolikalt. 12 tunni pärast peaksid ussid olema värvunud punakaks ja neid peaks saama hõlpsalt loendada, kuna nad lebavad substraadi pinnal. Teise võimalusena võib substraadi ja alkoholi segu enne usside loendamist läbi sõela lasta (sõela ava läbimõõt 0,250 mm). Selle tulemusena uhutakse kaoliniit, turvas ja osa liiva välja ning punakaks värvunud usse on lihtsam näha ja loendada. Loendamist hõlbustab ka valgustusega suurendusklaasi kasutamine (klaasi mõõtmed vähemalt 100 × 75 mm ja suurendusvõime 2–3 korda).

Kõnealuse värvimismeetodiga väheneb loendamisaeg mõnele minutile nõu kohta ning ühel inimesel peaks olema võimalik lõpetada kõikide ühest katsest pärit nõude analüüs maksimaalselt kahe päeva jooksul.

Vedelikuga ekstraheerimine

Vedelikuga ekstraheerimist tuleks alustada kohe pärast katse lõppemist. Igast katsenõust pärit muld tõstetakse plastsõelale, mille ava läbimõõt on umbes 1 mm. Sõelad pannakse plastkaussidesse rippuma nii, et sõel ei puuduta kausi põhja. Kausid täidetakse ettevaatlikult veega, kuni sõeltel olevad proovid jäävad täielikult vee alla. Et saada kätte üle 90 % mullas olevatest ussidest, tuleks neid ekstraheerida 3 päeva temperatuuril 20 ± 2 °C. Ekstraheerimisperioodi lõpus sõelad eemaldatakse ja vesi kallatakse aeglaselt ära, jättes alles vaid väikese koguse vett ning jälgides hoolikalt, et kausside põhjas olev sete jääks paigale. Seejärel loksutatakse plastkausse ettevaatlikult, et sete vees suspendeerida. Vesi viiakse Petri tassi ning pärast mullaosakeste settimist saab valgeliimukad tuvastada, pehmete teraspintsettidega eemaldada ja stereomikroskoobi abil loendada.

Vedelikupinnale toomine

Vedelikupinnale toomisel põhinevat meetodit on kirjeldanud oma märkuses R. Kuperman (4). Pärast katsenõu sisu fikseerimist etanooliga ujutatakse muld üle Ludoxiga (AM-30, kolloidse ränidioksiidi 30 massiprotsendiline suspensioon vees), nii et vedeliku tase jääb mullapinnast 10–15 mm kõrgemale. Pärast mulla põhjalikku segamist vedelikuga 2–3 minuti vältel saab pinnale kerkinud noored ussid hõlpsalt ära loendada.

VIITED

(1) Korinkova, J., ja Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting. Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, lk 300–305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R., ja Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 lk.

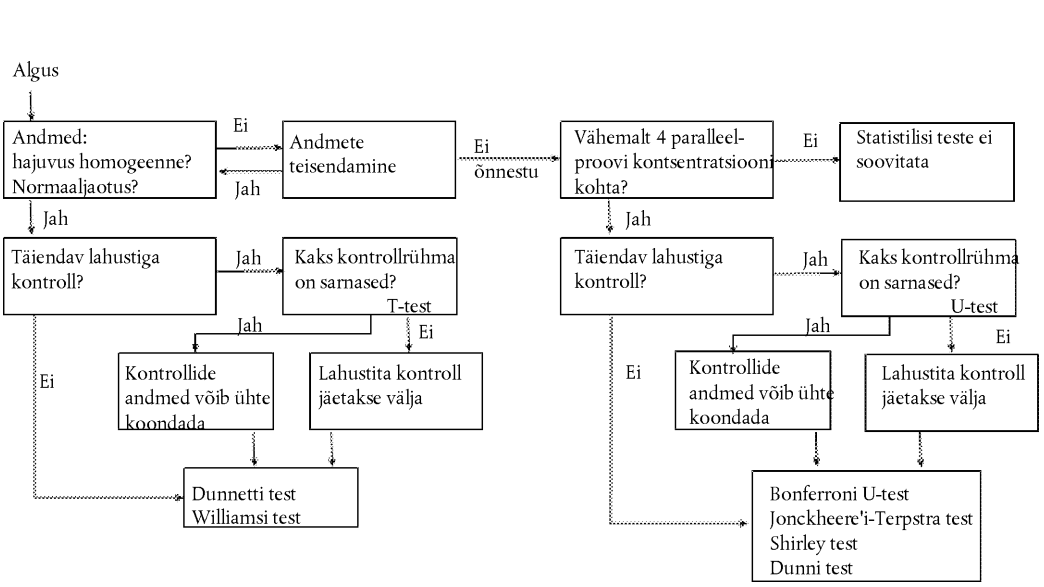
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R. P. M., ja Dirven-Van Breemen, E. M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Environ. Safe*. 38: 108–121.

(4) Phillips, C. T., Checkai, R. T., ja Kuperman, R. G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, lk 157.

▼**M6**

7. liide

Andmete statistilise analüüsi ülevaade (täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramine)



▼M6

C.33. VIHMAUSSIDE (*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*) SIGIVUSE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 222 (2004). Meetod on ette nähtud selleks, et hinnata pinnases esinevate kemikaalide mõju liikidesse *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) ja *Eisenia andrei* (Andre, 1963) kuuluvate vihmausside järglaste arvule (ja muudele uuritavatele subletaalsetele näitajatele) (1, 2). See katsemeetod on võrdlusuuringuga valideeritud (3). On olemas katsemeetod vihmaussidele avalduva ägeda mürgisuse hindamiseks (4). Samuti on avaldatud mitmed rahvusvahelised ja siseriiklikud suunised vihmaussidele avalduva ägeda ja kroonilise mürgisuse katsete kohta (5, 6, 7, 8).

2. Liike *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* käsitatakse mullafauna ja eelkõige vihmausside esindajatena. Taustteave vihmausside ökoloogia kohta ja nende kasutamise kohta ökotoksikoloogilistes katsetes on kättesaadav allikates 7, 9, 10, 11 ja 12.

KATSE PÕHIMÕTE

3. Täiskasvanud ussid viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on eri kontsentratsioonides kas mullaga segatud või pestitsiidide puhul mulda viidud või mullapinnale kantud meetodil, mis on kooskõlas asjaomase kemikaali kasutusviisiga. Kemikaaliga töötlemise meetod sõltub katse eesmärgist. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik valitakse nii, et see hõlmaks kontsentratsioone, mille puhul kemikaal avaldab kaheksa nädala vältel nii subletaalset kui ka surmavat mõju. Täiskasvanud usside suremust ja mõju nende kasvule hinnatakse pärast 4 nädala pikkust kokkupuuteperioodi. Seejärel eemaldatakse täiskasvanud isendid mullast ja pärast veel 4 nädala möödumist tehakse kindlaks mõju sigivusele, loendades mullas leiduvad järglased. Uuritava kemikaaliga kokku puutunud usside sigivust võrreldakse sigivusega kontrollrühma(de)s, et teha kindlaks: i) täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon ja/või ii) EC_x (nt EC_{10}, EC_{50}), kasutades regressioonimudelit sellise hinnangulise kontsentratsiooni leidmiseks, mille puhul sigivus väheneb x % võrra. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x (nt EC_{10}, EC_{50}) väärtust, nii et EC_x leitakse interpoleerimise, mitte ekstrapoleerimise teel (mõisted on määratletud 1. liites).

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

4. Uuritava kemikaali kohta peaks sobivate katsetingimuste väljatöötamise hõlbustamiseks olema teada järgmised andmed:

   — lahustuvus vees;

   — log K_{ow};

   — aururõhk;

   — võimaluse korral teave kemikaali säilivuse ja omaduste kohta keskkonnas (nt fotolüüsi ja hüdrolüüsi kiirus, kui see on asjaomase töötlemisviisi puhul asjakohane).

5. Käesolevat katsemeetodit kasutatakse kõikide kemikaalide puhul, olenemata nende lahustuvusest vees. Meetodit ei saa kasutada lenduvate kemikaalide puhul, mille Henry konstant või jaotuskoefitsient süsteemis õhk/vesi on suurem kui üks, ega kemikaalide puhul, mille aururõhk 25 °C juures on suurem kui 0,0133 Pa.

6. Käesolevas katsemeetodis ei võeta arvesse uuritava kemikaali võimalikku lagunemist katse kestel. Sellest tulenevalt ei saa eeldada, et kokkupuutekontsentratsioon jääb kogu katse vältel algsele tasemele. Sellisel juhul on soovitatav teha uuritava kemikaali keemiline analüüs katse alguses ja lõpus.

▼M6

VÕRDLUSKEMIKAAL

7. Tuleb määrata võrdluskemikaali EC_x ja/või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon, et tagada laboris kasutatavate katsetingimuste sobivus ja veenduda, et katseorganismide reaktsioon ei muutu aja jooksul statistiliselt olulisel määral. Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kord aastas või kui katseid tehakse harvem, siis uuritava kemikaali mürgisuse määramisega samaaegselt. Sobivad võrdluskemikaalid, mille mõju sigivusele on tõendatud, on karbendasiim ja benomüül (3). Oluline mõju peaks olema täheldatav vahemikus a) 1–5 mg toimeainet kuivmassi kilogrammi kohta või b) 250–500 g/ha ehk 25–50 mg/m^2. Kui katseseerias kasutatakse positiivse kontrollina mürgist võrdluskemikaali, kasutatakse ühte kontsentratsiooni ning asjaomaste paralleelnõude arv peaks olema sama kui kemikaalita kontrollrühmas.

KATSE NÕUETEKOHASUS

8. Katsetulemus loetakse nõuetekohaseks, kui kontrollrühmas on täidetud järgmised kriteeriumid:

— sigitatud noorloomade arv igas paralleelnõus, mis sisaldab 10 täiskasvanud isendit, on katse lõpuks ≥ 30;

— sigivuse variatsioonikordaja on ≤ 30 %;

— täiskasvanud usside suremus esimese 4 katsenädala jooksul on ≤ 10 %.

Kui katse ei vasta eespool nimetatud nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleks see lõpetada, välja arvatud juhul, kui katse jätkamist on võimalik põhjendada. Selline põhjendus tuleks esitada katseprotokollis.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Seadmed

9. Tuleks kasutada klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist katsenõusid mahuga umbes 1–2 liitrit. Nõude põhjapindala peaks olema umbes 200 cm^2, nii et 500–600 grammise kuivmassiga substraadi lisamisel saavutatav niiske substraadi sügavus on umbes 5–6 cm. Nõu kaas peaks olema sellise ehitusega, mis võimaldab gaasivahetust substraadi ja atmosfääri vahel ning valguse juurdepääsu (nt läbipaistev augustatud kaas), kuid takistab samal ajal usside põgenemist. Kui katsesubstraadi kogus on oluliselt suurem kui 500–600 g katsenõu kohta, tuleks usside arvu samavõrra suurendada.

10. On vaja tavapäraseid laboriseadmeid, täpsemalt järgmist:

— kuivatuskapp;

— stereomikroskoop;

— pH-meeter ja fotomeeter;

— sobiv täpne kaal;

— sobivad temperatuuri reguleerimise seadmed;

— sobivad niiskuse reguleerimise seadmed (ei ole hädavajalikud, kui kokkupuutenõu on kaanega);

— inkubaator või väike kliimaseadmega ruum;

— pintsetid, konksud või aasad;

— veevann.

▼M6

Kunstliku mulla valmistamine

11. Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse kunstlikku mulda (5, 7), mille koostis on järgmine (kuivmassi põhjal pärast kuumutamist 105 °C juures, kuni mass enam ei muutu):

— 10 % turbasamblaturvast (pH võimalikult lähedal väärtusele 5,5–6,0, nähtavate taimejäänusteta, peeneks jahvatatud, teadaoleva niiskusesisalduseni kuivatatud);

— 20 % kaoliinsavi (soovitatav kaoliniidisisaldus üle 30 %);

— 0,3–1,0 % kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$, pulbristatud, analüütilise puhtusastmega), et saavutada pH algväärtus 6,0 ± 0,5;

— 70 % kvartsliiva (sõltuvalt vajalikust $CaCO_3$ kogusest), mis on õhu käes kuivatatud ja koosneb peamiselt peenest liivast, millest üle 50 % moodustavad osakesed suurusega 50–200 mikromeetrit.

Märkus 1: vajalik $CaCO_3$ kogus sõltub mullasubstraadi koostisosadest, sealhulgas söödast, ja tuleks mulla osaproovide mõõtmise teel kindlaks teha vahetult enne katset. pH-d kokkusegatud proovis mõõdetakse 1 M kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M kaltsiumkloriidi ($CaCl_2$) lahuses (13).

Märkus 2: kunstliku mulla orgaanilise süsiniku sisaldust võib vähendada, vähendades näiteks turbasisaldust 4–5 protsendini ja suurendades vastavalt liivasisaldust. Orgaanilise süsiniku sisalduse sellise vähendamise tulemusena võib väheneda mulla (orgaanilise süsiniku) võime uuritavat kemikaali adsorbeerida ning kemikaali saadavus ussidele võib suureneda. On tõendatud, et *Eisenia fetida* puhul on sigivust käsitlevad nõuetekohasuse kriteeriumid täidetavad, kui katse tehakse põllumullas, milles orgaanilise süsiniku sisaldus on väiksem (näiteks 2,7 %) (14), ning seniste kogemuste põhjal on võimalik seda saavutada ka kunstlikus mullas, mille turbasisaldus on 5 %. Seepärast ei ole enne sellise mulla kasutamist lõplikus katses vaja tõendada, et kõnealuse kunstliku mulla puhul on katse nõuetekohasuse kriteeriumid täidetavad, välja arvatud juhul, kui turbasisaldust vähendatakse eespool osutatust rohkem.

Märkus 3: kui tehakse lisakatseid (nt kõrgema tasandi katseid) loodusliku mullaga, tuleks tõendada ka sellise mulla sobivust ja katse nõuetekohasuse kriteeriumide täidetavust.

12. Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (nt suure mahutavusega laborisegistis) hästi ventileeritavas kohas. Enne katse alustamist niisutatakse kuiva kunstlikku mulda piisava koguse deioniseeritud vee lisamise teel, et saavutada veesisaldus, mis on umbes poole väiksem kui lõplik veesisaldus, mis jääb vahemikku 40–60 % (50 ± 10 %) maksimaalsest veemahutavusest (vee suurim võimalik sisaldus osakaaluna kuivmassist). Nii saadakse substraat, milles ei täheldata vaba sidumata vett, kui seda peos pigistada. Kunstliku mulla maksimaalne veemahutavus määratakse vastavalt 2. liites, standardis ISO 11274 (15) või sellega samaväärses ELi standardis kirjeldatud meetodile.

13. Kui uuritav kemikaal kantakse mullapinnale või segatakse mullaga ilma veeta, võib lisada kunstlikule mullale ülejäänud koguse vett mulla valmistamise ajal. Kui uuritava kemikaali segamisel mullaga kasutatakse teatud koguses vett, võib ülejäänud vee lisada koos uuritava kemikaaliga (vt punkt 19).

14. Mulla niiskusesisaldus määratakse katse alguses ja lõpus vastavalt standardile ISO 11465 (16) või sellega samaväärsele ELi standardile ning mulla pH vastavalt 3. liitele, standardile ISO 10390 (13) või sellega samaväärsele ELi standardile. Kõnealuseks määramiseks tuleks kasutada kontrollmulla proovi

▼M6

ja igale katsekontsentratsioonile vastavat mullaproovi. Kui katses kasutatakse happelist või aluselist kemikaali, ei tohiks mulla pH-d muuta. Niiskusesisaldust tuleks jälgida kogu katse vältel, kaaludes nõusid korrapäraselt (vt punktid 26 ja 30).

Katseloomade valimine ja ettevalmistamine

15. Katses kasutatav liik on *Eisenia fetida* või *Eisenia andrei* (1, 2). Katse alustamiseks on vaja vööga täiskasvanud usse vanuses kaks kuud kuni üks aasta. Ussid tuleks valida sünkroonitud kultuurist, kus vanuseline struktuur on suhteliselt homogeenne (4. liide). Ühe katserühma isendite vanusevahe ei tohiks olla suurem kui 4 nädalat.

16. Valitud ussidel tuleks lasta vähemalt üks ööpäev kohaneda katses kasutatavaga sama tüüpi kunstlikus mullasubstraadis. Selle aja vältel tuleks ussidele anda sama sööta, mida kasutatakse katses (vt punktid 31–33).

17. Katse alguses tuleks kümnest ussist koosnevad rühmad ükshaaval ära kaaluda ja juhuslikkuse alusel katsenõudesse jaotada. Enne kaalumist pestakse usse deioniseeritud veega ja liigse vee eemaldamiseks asetatakse ussid lühikeseks ajaks filterpaberile. Iga ussi elusmass peaks jääma vahemikku 250–600 mg.

Katsekontsentratsiooniga segude valmistamine

18. Uuritava kemikaaliga töötlemiseks võib kasutada kahte meetodit: uuritava kemikaali segamine mullaga (vt punktid 19–21) või kemikaali kandmine mullapinnale (vt punktid 22–24). Sobiva meetodi valimisel lähtutakse katse eesmärgist. Üldjuhul soovitatakse uuritava kemikaali segamist mullaga. Siiski võib olla vaja kasutada töötlemismeetodit, mis on kooskõlas põllumajandustavaga (nt vedelal kujul pihustamine või pestitsiidi erivormide, näiteks graanulite või seemnepuhtimisvahendite kasutamine). Lahustid, mis hõlbustavad mulla töötlemist uuritava kemikaaliga, tuleks valida lähtuvalt nende vähesest mürgisusest vihmaussidele ning katseplaani tuleb lisada asjakohane lahustiga kontroll (vt punkt 27).

Uuritava kemikaali segamine mullaga

Vees lahustuv uuritav kemikaal

19. Uuritava kemikaali lahus valmistatakse vahetult enne katse algust deioniseeritud vees sellises koguses, millest piisab kõikidele ühe katsekontsentratsiooni puhul kasutatavatele paralleelkultuuridele. Katselahuse valmistamise hõlbustamiseks võib olla vaja kaaslahustit. On otstarbekas valmistada selline kogus lahust, mis on vajalik lõpliku niiskusesisalduse (40–60 % maksimaalsest veemahutavusest) saavutamiseks. Lahus segatakse põhjalikult mullasubstraadiga enne mulla viimist katsenõusse.

Vees lahustumatu uuritav kemikaal

20. Uuritav kemikaal lahustatakse väikeses koguses sobivas orgaanilises lahustis (nt atsetoon) ning pihustatakse seejärel väikesele kogusele peenele kvartsliivale või segatakse sellega. Lahusti kõrvaldatakse vähemalt mõni minut kestva tõmbekapis aurustamise teel. Seejärel segatakse töödeldud liiv eelniisutatud kunstliku mullaga põhjalikult. Lisatakse vajalik kogus deioniseeritud vett, et saavutada lõplik niiskusesisaldus 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest, ja segatakse see mullaga. Seejärel on muld katsenõudesse viimiseks valmis. Tuleks arvestada, et mõni lahusti võib olla vihmaussidele mürgine.

▼M6

Vees ja orgaanilistes lahustites lahustumatu uuritav kemikaal

21. Valmistatakse segu, mis sisaldab 10 g peeneks jahvatatud tööstuslikku kvartsliiva ja sellises koguses uuritavat kemikaali, mis on vajalik katsekontsentratsiooni saavutamiseks mullas. Seejärel segatakse kõnealune segu eelniisutatud kunstliku mullaga põhjalikult. Lisatakse vajalik kogus deioniseeritud vett, et saavutada lõplik niiskusesisaldus 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest, ja segatakse see mullaga. Seejärel on muld katsenõudesse viimiseks valmis.

Kemikaali kandmine mullapinnale

22. Mulda töödeldakse pärast usside lisamist. Esmalt täidetakse katsenõud niisutatud mullasubstraadiga ja eelnevalt kaalutud ussid asetatakse mullapinnale. Terved ussid kaevuvad tavaliselt kohe substraati ning seepärast loetakse kõik ussid, kes on 15 minuti pärast veel mullapinnal, kahjustatuks ja need tuleb asendada. Usside väljavahetamisel tuleks asendatavad ja uued ussid kaaluda, et kemikaaliga kokku puutuvate usside rühma summaarne eluskaal ja usse sisaldava nõu üldkaal katse alguses oleks teada.

23. Lisatakse uuritav kemikaal. Kemikaali ei tohiks lisada mullale usside lisamisele järgneva poole tunni jooksul (või kui usse leidub mullapinnal), et ei toimuks otsest nahakaudset kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Kui uuritav kemikaal on pestitsiid, võib olla asjakohane kanda see mullapinnale pihustamise teel. Uuritav kemikaal tuleks mullapinnale kanda võimalikult ühtlaselt, kasutades sobivat laboratoorset pihustusseadet, et jäljendada kemikaali pihustamist välitingimustes. Enne kemikaaliga töötlemist tuleks katsenõu kaas eemaldada ja asendada vooderdisega, mis kaitseb nõu seinu pritsmete eest. Sellise vooderdise võib teha katsenõust, mille põhi on eemaldatud. Kemikaaliga töötlemine peaks toimuma temperatuuril 20 ± 2 °C ning vesilahuste, -emulsioonide ja -dispersioonide puhul peaks töötlemisel kasutatava vee kogus olema 600–800 µl/m^2. Õige koguse tagamiseks tuleks kasutada sobivat kaliibrimismeetodit. Erivormid, näiteks graanulid või seemnepuhtimisvahendid tuleks mullapinnale kanda viisil, mis on kooskõlas nende põllumajandusliku kasutusviisiga.

24. Katsenõud tuleks jätta üheks tunniks kaaneta, et lasta uuritava kemikaaliga töötlemisel kasutatavatel lenduvatel lahustitel aurustuda. Tuleks jälgida, et selle aja jooksul ei lahkuks ükski uss katsenõust.

KATSE KÄIK

Katse- ja kontrollrühmad

25. Soovitatavalt lisatakse 500–600 grammise kuivmassiga kunstlikku mulda 10 vihmaussi (st 50–60 g mulda ussi kohta). Kui kasutatakse suuremat mullakogust, näiteks töötlemisel sellise pestitsiidi erivormiga nagu seemnepuhtimisvahend, tuleks selleks, et säilitada vahekorda 50–60 g mulda ussi kohta, usside arvu suurendada. Iga kontroll- ja katsenõu kohta valmistatakse ette 10 ussi. Ussid pestakse veega puhtaks, pühitakse kuivaks ja asetatakse lühikeseks ajaks kuivatuspaberile, et liigne vesi saaks ära nõrguda.

26. Süstemaatiliste vigade ärahoidmiseks usside jaotamisel katsenõudesse tuleks katsepopulatsiooni homogeensuses veendumiseks kaaluda ühekaupa ära 20 ussi, kes valitakse juhuvaliku alusel populatsioonist, millest võetakse katses kasutatavad ussid. Pärast homogeensuses veendumist valitakse välja usside rühmad, kaalutakse need ja viiakse juhuslikkuse alusel katsenõudesse.

▼M6

Usside lisamise järel tuleks määrata iga katsenõu algkaal, et selle põhjal oleks võimalik jälgida mulla niiskusesisaldust katse vältel, nagu on kirjeldatud punktis 30. Seejärel kaetakse katsenõud punktis 9 kirjeldatud viisil ja paigutatakse katsekambrisse.

27. Iga punktides 18–24 kirjeldatud meetodi puhul, mida kasutatakse uuritava kemikaaliga töötlemiseks, valmistatakse ka asjakohased kontrollkultuurid. Selleks järgitakse asjaomast kirjeldatud meetodit, ent ainsa erinevusena jäetakse uuritav kemikaal lisamata. Seega töödeldakse kontrollkultuure vajaduse korral orgaanilise lahusti, kvartsliiva või muu kandeainega, kasutades sama kontsentratsiooni või koguselist määra kui uuritava kemikaaliga kultuuride puhul. Kui uuritava kemikaali lisamiseks kasutatakse lahustit või muud kandeainet, tuleks katses kasutada veel ühte kandeaineta ja uuritava kemikaalita kontrolli, et veenduda, et kandeaine ei mõjuta katsetulemusi.

Katsetingimused

28. Katsetemperatuur on 20 ± 2 °C. Katses kasutatakse kontrollitavat valgustusrežiimi (soovitatavalt 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust) ja katsenõude inkubeerimisalal valgustustihedust 400–800 luksi.

29. Katsenõusid ei aereerita katse vältel, kuid katsenõu kaane ehitus peaks võimaldama gaasivahetust ja samal ajal piirama vee aurustumist (vt punkt 9).

30. Mullasubstraadi veesisaldust katsenõudes hoitakse katse vältel konstantsena, kaaludes katsenõusid (ilma kaaneta) korrapäraselt. Vajaduse korral lisatakse veekao korvamiseks deioniseeritud vett. Veesisaldus ei tohiks katse alguses täheldatud väärtusega võrreldes kõikuda rohkem kui 10 %.

Söötmine

31. Vastuvõetavaks loetakse sellise kvaliteediga sööt, mille puhul on tõendatud, et see sobib vähemalt usside kehakaalu säilitamiseks katse vältel. Kogemusest nähtub, et sobiv sööt on kaerajahu, lehmasõnnik või hobusesõnnik. Tuleks kontrollida, et lehmadele või hobustele, kellelt sõnnik pärineb, ei manustata ussidele katse ajal kahjulikku mõju avaldada võivaid ravimeid ega kemikaale, näiteks kasvu soodustavaid aineid, nematotsiide või sarnaseid veterinaarravimeid. Soovitatakse kasutada oma kogutud lehmasõnnikut, kuna kogemusest nähtub, et müügilolev aiaväetisena kasutatav lehmasõnnik võib mõjuda ussidele kahjulikult. Sõnnik tuleks enne kasutamist õhu käes kuivatada, peeneks jahvatada ja pastöriseerida.

32. Iga uue söödapartii sobivas kvaliteedis veendumiseks tuleks enne selle katses kasutamist sööta sellega usside kultuuri, millega katset ei tehta. Kõnealuste usside kasv ja kookonite moodustamine ei tohiks olla pärsitud nende ussidega võrreldes, keda kasvatatakse substraadis, mis ei sisalda uuest partiist pärit sööta (tingimuste kirjeldus on esitatud katsemeetodis C.8 (4)).

33. Sööta lisatakse esmakordselt üks ööpäev pärast usside lisamist ja mulla töötlemist uuritava kemikaaliga. Igasse nõusse puistatakse mullapinnale umbes 5 g sööta ja see niisutatakse deioniseeritud veega (umbes 5–6 ml nõu kohta). Edaspidi lisatakse sööta 4 nädala pikkuse katseperioodi vältel

▼M6

kord nädalas. Kui sööt jäetakse söömata, tuleks söödakogust seente kasvu ja hallituse ärahoidmiseks vähendada. Täiskasvanud isendid eemaldatakse mullast 28. katsepäeval. Seejärel lisatakse igasse nõusse veel 5 g sööta. Katse lõpuni jäänud 4 nädala jooksul söötmist enam ei toimu.

Katsekontsentratsioonide valimine

34. Sobivate katsekontsentratsioonide valimisel on kasu varasemast teabest uuritava kemikaali mürgisuse kohta, näiteks ägeda mürgisuse hindamise katse (4) ja/või kontsentratsioonivahemiku leidmise katse tulemustest. Vajaduse korral tehakse kontsentratsioonivahemiku leidmise katse, milles kasutatakse näiteks viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni: 0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Iga katserühma ja kontrollrühma puhul piisab ühest nõust. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kestus on kaks nädalat ja suremust hinnatakse katse lõpus.

Katseplaan

35. Kuna käesoleva katsemeetodi puhul ei saa sätestada ühte kokkuvõtlikku näitajat, nähakse ette, et määratakse nii täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon kui ka EC_x. Lähitulevikus nõuavad reguleerivad asutused tõenäoliselt, et määrataks täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon. EC_x võidakse lähemal ajal statistilistel ja ökoloogilistel kaalutlustel laiemalt kasutusele võtta. Seepärast pakutakse välja kolm katseplaani, mis tuginevad valgeliimuklaste sigivuse hindamise meetodit käsitleva võrdlusuuringu põhjal esitatud soovitustele.

36. Kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramisel tuleks meeles pidada järgmist.

— Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramiseks tuleks kasutada vähemalt viit/kahteteist kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 2,0.

— EC_x (nt EC_{10}, EC_{50}) määramiseks soovitatakse kasutada piisavat arvu eri kontsentratsioone, et saada selles kontsentratsioonivahemikus vähemalt neli statistiliselt oluliselt erinevat vastuse keskväärtust. Soovitatakse kasutada vähemalt kahte paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja kuut paralleelnõu kontrollrühmas. Kontsentratsioonide jada tegur võib varieeruda, st olla eeldatavas mõju avaldumise vahemikus 1,8 või väiksem ning sellest vahemikust väljaspool olevate suuremate ja väiksemate kontsentratsioonide puhul üle 1,8.

— Kombineeritud lähenemisviis võimaldab määrata nii täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) kui ka EC_x. Tuleks kasutada kaheksat uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 1,8.

Katse kestus ja mõõtmised

37. Elus täiskasvanud usse jälgitakse ja need loendatakse 28. katsepäeval. Registreeritakse ebaharilik käitumine (nt võimetus mulda kaevuda või liikumatult lamamine) ja muutused morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine). Seejärel eemaldatakse kõik täiskasvanud ussid katsenõudest ning loendatakse ja kaalutakse. Täiskasvanud isendite leidmist võib hõlbustada usse sisaldava mulla tõstmine puhtale kandikule hindamise eel. Mullast eemaldatud usse tuleks enne kaalumist pesta deioniseeritud veega ja asetada need liigse vee eemaldamiseks lühikeseks ajaks filterpaberile. Eemaldamise käigus leidmata jäänud ussid registreeritakse surnud ussidena, kuna tuleb eeldada, et nad surid ja lagundati enne hindamist.

▼M6

38. Kui muld on eelnevalt nõust välja tõstetud, viiakse see nõusse tagasi (ilma täiskasvanud ussideta, kuid koos kõikide moodustatud kookonitega). Seejärel inkubeeritakse mulda veel neli nädalat samades katsetingimustes, selle erandiga, et sööta lisatakse vaid ühe korra kõnealuse katseetapi alguses (vt punkt 33).

39. Teise neljanädalase perioodi lõpus määratakse katsemullas olevate kookonite arv ja neist koorunud noorloomade arv, kasutades 5. liites kirjeldatud meetodit. Katse kestel tuleks registreerida ka kõik ussidel täheldatavad kahjustused ja kahjuliku mõju ilmingud.

Piirsisalduskatse

40. Kui kontsentratsioonivahemiku leidmise katses ei täheldata suurimal kasutatud kontsentratsioonil (nt kontsentratsioonil 1 000 mg/kg) mingit mõju, tehakse sigivuskatse piirsisalduskatsena, kasutades kontsentratsiooni 1 000 mg/kg. Piirsisalduskatse võimaldab tõendada, et täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon on sigivuse puhul suurem kui kõnealune piirkontsentratsioon, ning samal ajal minimeerida katses kasutatavate usside arvu. Nii uuritava kemikaaliga mulla kui ka kontrollmulla puhul tuleks kasutada kaheksat paralleelnõu.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

41. Käesolevas katsemeetodis ei anta lõplikke juhiseid katsetulemuste statistilise analüüsi kohta, kuid asjakohane ülevaade on esitatud 6. liites.

42. Üks lõppnäitaja on suremus. Siiski tuleks registreerida ka muutused täiskasvanud isendite käitumises (nt võimetus mulda kaevuda või katsenõu klaasseina vastas liikumatult lamamine) ja morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine), samuti noorloomade esinemine. Üldjuhul tuleks kasutada LC_{50} leidmiseks probitanalüüsi (18) või logistilist regressiooni. Selle analüüsimeetodi sobimatuse korral (nt kui andmed hõlmavad vähem kui kolme kontsentratsiooni, mille puhul täheldatakse osalist suremust) võib kasutada mõnda alternatiivset meetodit. Kõnealuse meetodina võib muu hulgas kasutada libiseva keskmise meetodit (19), kohandatud Spearmani-Kärberi meetodit (20) või lihtsat interpoleerimist (nt LC_0 ja LC_{100} geomeetrilist keskmist, mis on saadud LC_0 ja LC_{100} korrutisest ruutjuure võtmise teel).

43. Teine lõppnäitaja on sigivus (nt sigitatud noorloomade arv). Sarnaselt kontsentratsioonivahemiku leidmise katsele tuleks lõpp-protokolli siiski märkida ka kõik muud kahjuliku mõju ilmingud. Statistilise analüüsi käigus on vaja arvutada sigivuse aritmeetiline keskmine $\bar{x}$ ja standardhälve igas katse- ja kontrollrühmas.

44. Dispersioonanalüüsi tegemise korral võib standardhälbe s ja selle vabadusastmete arvu df asendada vastavalt dispersioonianalüüsi (ANOVA) tulemusena leitud hajuvuse hinnangulise koondmäära ja selle vabadusastmete arvuga, eeldusel, et hajuvus ei sõltu kontsentratsioonist. Sellisel juhul kasutatakse kontroll- ja katserühmade puhul ühte hajuvuse väärtust. Kõnealused väärtused arvutatakse tavaliselt müügiloleva statistilise analüüsi programmi abil, kasutades paralleelidena igas eraldi nõus saadud tulemusi. Kui ilmneb, et negatiivse kontrolli ja lahustiga kontrolli andmete koondamine on mõistlikum kui võrdlemine ühe nimetatud kontrolliga, tuleks veenduda, et asjaomased andmed ei ole oluliselt erinevad (selleks sobivatele meetoditele osutatakse punktis 47 ja 6. liites).

45. Edasine statistiline analüüs ja järeldused sõltuvad sellest, kas paralleelnõudes saadud väärtused on normaaljaotusega ja kas nende hajuvus on homogeenne.

▼M6

Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) hindamine

46. Soovitatavalt tuleks kasutada suure võimsusega meetodit. Et hinnata andmete jaotuse ligikaudset vastavust normaaljaotusele, tuleks kasutada varasemal kogemusel, näiteks võrdlusuuringu andmetel või muudel varasematel andmetel põhinevat teavet. Hajuvuse homogeensus (homoskedastiivsus) on suurema tähtsusega. Kogemusest nähtub, et hajuvus suureneb sageli keskväärtuse suurenedes. Sellisel juhul võib homoskedastiivsuse saavutamiseks olla kasu andmete teisendamisest. Kõnealuse teisendamise puhul tuleks siiski lähtuda varasematel andmetel põhinevast kogemusest, mitte analüüsitavatest andmetest. Homogeensete andmete puhul tuleks kasutada mitmest t-testi, näiteks Williamsi testi (α = 0,05; ühepoolne) (21, 22) või teatavatel juhtudel Dunnetti testi (23, 24). Tuleks tähele panna, et paralleelnõude andmete ebavõrdse hajuvuse korral tuleb tabelis esitatud t-väärtusi Dunnetti ja Williamsi kirjeldatud viisil korrigeerida. Mõnikord ei suurene/-vähene saadud väärtused suurest varieeruvusest tingituna korrapäraselt. Sellise suure monotoonsusest kõrvalekaldumise puhul on asjakohasem kasutada Dunnetti testi. Homoskedastiivsusest kõrvalekaldumise puhul võib olla mõistlik hinnata võimalikku mõju hajuvusele lähemalt, et oleks võimalik otsustada, kas asjaomaseid t-teste saab kasutada võimsust oluliselt kaotamata (25). Teise võimalusena võib kasutada mitmest U-testi, näiteks Bonferroni U-testi vastavalt Holmile (26), või heteroskedastiivsete andmete puhul, mis muidu vastavad üldisele monotoonsele kontsentratsioonist sõltuvusele, mõnda muud mitteparameetrilist (nt Jonckheere'i-Terpstra (27, 28) või Shirley (29, 30)) testi; sellist testi tuleks üldjuhul eelistada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testile (vt ka skeem, 6. liide).

47. Kui on tehtud piirsisalduskatse ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeensus) on täidetud, võib kasutada paariviisilist Studenti t-testi või ka Manni-Whitney U-testi (31).

EC_x leidmine

48. Mis tahes EC_x väärtuse arvutamiseks regressioonanalüüsi (lineaarse või mittelineaarse regressiooni) teel kasutatakse katserühmade andmete keskväärtusi, mille alusel leitakse kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust kirjeldav sobiv funktsioon. Pideva tunnusena vaadeldava usside kasvu puhul võib EC_x väärtuste leidmiseks kasutada sobivat regressioonanalüüsi (32). Binaarsete andmete (suremus/elulemus) ja sigitatud järglaste arvu puhul sobivad funktsioonid on muu hulgas normaaljaotuse sigmoidfunktsioon, logistiline funktsioon ja Weibulli funktsioon, mis hõlmavad kahte kuni nelja parameetrit ja millest mõni sobib ka hormeetilise mõju modelleerimiseks. Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust väljendava funktsiooni leidmiseks kasutatakse lineaarset regressiooni, tuleks enne EC_x määramist veenduda regressioonanalüüsi teel r^2 (määratusekordaja) ja/või tõusu väärtuse olulisuses; EC_x arvutamiseks sisestatakse regressioonanalüüsi tulemusena saadud võrrandisse väärtus, mis vastab x protsendile kontrollrühma keskväärtusest. Usalduspiirid usaldusnivool 95 % arvutatakse vastavalt Fiellerile (viidanud Finney (18)) või mõne muu sobiva kaasaegse meetodi abil.

49. Teise võimalusena väljendatakse mõju protsentuaalse või lihtosakaaluna kontrollrühma näitaja keskväärtusest, mida käsitatakse mudeli parameetrina. Sellisel juhul on normaaljaotusele vastava (logistilise, Weibulli) sigmoidse kõvera lähendamiseks andmetele sageli võimalik hõlpsalt kasutada probitanalüüsil põhinevat regressioonimeetodit (18). Kõnealusel juhul tuleb kaalufunktsiooni kohandada arvulise tunnuse analüüsimiseks, nagu on kirjeldanud Christensen (33). Hormeesi ilmnemisel tuleks probitanalüüsi asemel siiski rakendada neljaparameetrilist logistilist või Weibulli funktsiooni, kasutades lähendamiseks mittelineaarset regressiooni (34). Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust väljendava sobiva funktsiooni lähendamine andmetele ei ole võimalik, võib EC_x hinnangulise väärtuse ja asjaomaste usaldus-piiride määramiseks kasutada muud meetodit, näiteks libiseva keskmise meetodit vastavalt Thompsonile (19) või kohandatud Spearmani-Kärberi meetodit (20).

KATSEPROTOKOLL

50. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

▼**M6**

Uuritav kemikaal:

— uuritava kemikaali täielik kirjeldus, partii, CASi number, puhtus;

— uuritava kemikaali omadused (nt log K_{ow}, lahustuvus vees, aururõhk, Henry konstant (H) ning teave kemikaali säilivuse ja omaduste kohta keskkonnas).

Katseorganismid:

— kasutatud katseloomad: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;

— katseorganismide vanus ja suurusevahemik (massivahemik).

Katsetingimused:

— katsemulla valmistamise üksikasjad;

— mulla maksimaalne veemahutavus;

— selle meetodi kirjeldus, mida kasutati mulla töötlemiseks uuritava kemikaaliga;

— üksikasjad abikemikaalide kohta, mida kasutati uuritava kemikaaliga töötlemiseks;

— vajaduse korral pihustusseadmete kaliibrimise üksikasjad;

— katseplaani ja katse läbiviimise kirjeldus;

— katsenõude suurus ja katsemulla kogus;

— katsetingimused: valgustustihedus, valgus- ja pimedusperioodi kestus, temperatuur;

— söötmisrežiimi kirjeldus, katses kasutatud sööda liik ja kogus, söötmiskuupäevad;

— mulla pH ja veesisaldus katse alguses ja lõpus.

Katsetulemused:

— täiskasvanud usside suremus (%) igas katsenõus katse esimese 4 nädala möödudes;

— täiskasvanud usside summaarne mass igas katsenõus katse alguses;

— elus täiskasvanud usside kehamassi muutus (% algsest kehamassist) igas katsenõus katse esimese 4 nädala möödudes;

— sigitatud noorloomade arv igas katsenõus katse lõpus;

— ilmsete ja patoloogiliste sümptomite ning selgete käitumuslike muutuste kirjeldus;

— võrdluskemikaaliga saadud tulemused;

— vastavalt vajadusele LC_{50}, sigivuse puhul määratud täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) ja/või EC_x (nt EC_{50}, EC_{10}) koos usaldusvahemikuga ning graafik asjaomase näitaja arvutamiseks kasutatud lähendatud kõveraga, samuti kõik tulemuste tõlgendamist hõlbustavad andmed ja tähelepanekud;

— kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;

— tulemused iga katsenõu kohta.

Kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse ajal täheldatud ebatavalised ilmingud.

KIRJANDUS

(1) Jaenicke, J. (1982). „*Eisenia foetida*" is two biological species. *Megadrilogica* 4: 6–8.

(2) Øien, N., ja Stenerson, J. (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Phys. C* 78: 277–282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. Väljaandes: Riepert, F., Kula, C. (1996), Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamt Land-Forstwirtsch., Berlin-Dahlem, 320, lk 50–82.

(4) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele".

(5) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(6) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No. 11268-1. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S. C., Bembridge, J. D., Holmstrup, M., ja Posthuma, L. (toim.). SETAC Press, 456 lk.

(8) USA Keskkonnakaitseamet (1996). Ecological Effects Test Guidelines: Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). USA Keskkonnakaitseamet, ennetamise, pestitsiidide ja mürgiste ainete büroo. EPA 712-C-96-167, aprill 1996.

(9) Bouché, M. B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C. A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Aruanne EUR 8714 EN, Euroopa Ühenduste Komisjon.

(11) Greig-Smith, P. W., Becker, H., Edwards, P. J., ja Heimbach, F. (toim.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C. A., ja Bohlen, J. P. (1996). Biology and Ecology of Earthworms, 3. väljaanne. Chapman & Hall, London.

(13) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(14) Hund-Rinke, K., Römbke, J., Riepert, F., ja Achazi, R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. Väljaandes: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W., ja Eisentraeger, A. (toim.). Spektrum Verl., Heidelberg. Lk 59–81.

(15) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1992). Soil Quality – Determination of water retention characteristics – Laboratory methods, No. 11274. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(16) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(17) Römbke, J., ja Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 lk.

▼**M6**

(18) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis (3. väljaanne), lk 19–76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M. A., Russo, R. C., ja Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol*. 11: 714–719; parandus: *Environ. Sci. Technol*. 12 (1978): 417.

(21) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.

(22) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519–531.

(23) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc*. 50: 1096–1121.

(24) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.

(25) van der Hoeven, N. (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355–361.

(26) Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat*. 6: 65–70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika* 41: 133–145.

(28) Terpstra, T. J. (1952). The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking. *Indagat. Math*. 14: 327–333.

(29) Shirley, E. A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies. *Appl. Stat*. 28: 144–151.

(30) Williams, D. A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control. *Biometrics* 42: 183–186.

(31) Sokal, R. R., ja Rohlf, F. J. (1981). Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 2. väljaanne. W. H. Freeman and Company, New York.

(32) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485–1494.

(33) Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Res*. 18: 213–221.

(34) Van Ewijk, P. H., ja Hoekstra, J. A. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox. Environ. Safe*. 25: 25–32.

▼M6

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Kemikaal – aine või segu.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC_{50} on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku või mulla pindala ühiku kohta.

LC_0 (kontsentratsioon, mille puhul surmav mõju puudub) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal ei surma teatava aja jooksul ühtki kemikaaliga kokku puutunud katseorganismi. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC_0 uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

LC_{50} (kontsentratsioon, mille puhul sureb pool katseorganismidest) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal surmab teatava aja jooksul 50 % kemikaaliga kokku puutunud katseorganismidest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC_{50} uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku või mulla pindala ühiku kohta.

LC_{100} (kontsentratsioon, mille puhul surevad kõik katseorganismid) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal surmab teatava aja jooksul 100 % kemikaaliga kokku puutunud katseorganismidest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC_{100} uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon – uuritava kemikaali väikseim kontsentratsioon, mille juures täheldatakse statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku või mulla pindala ühiku kohta. Kõikidel sellisest kontsentratsioonist suurematel katsekontsentratsioonidel peaks üldjuhul täheldatama kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist mõju. Mis tahes kõrvalekaldeid eespool esitatud määratlusest tuleb katseprotokollis põhjendada.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähimat täheldatavat toimet avaldavat kontsentratsiooni. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

Sigivuse määr – katseperioodi jooksul sigitatud noorloomade keskmine arv teatava arvu täiskasvanud usside kohta.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M6

2. liide

Mulla maksimaalse veemahutavuse määramine

On leitud, et mulla maksimaalse veemahutavuse määramiseks sobib järgmine meetod. Seda kirjeldatakse standardi ISO/DIS 11268-2 (1) C lisas.

Sobiva proovivõtuseadme (puuriga toru vmt) abil kogutakse kindlaksmääratud kogus (nt 5 g) katsemulda. Toru alumine ots kaetakse filterpaberi tükiga, toru täidetakse veega ja pannakse resti peale veevanni. Toru tuleks lasta vette vähehaaval, kuni veetase on mullapinnast kõrgemal. Seejärel tuleks toru umbes kolmeks tunniks vette jätta. Kuna muld ei suuda hoida kogu kapillaaridesse absorbeerunud vett, tuleks mullaproovil lasta kahe tunni vältel nõrguda, asetades toru väga märja peeneks jahvatatud kvartsliiva kihile, mis paikneb kuivamise ärahoidmiseks suletud nõus. Seejärel tuleks proov kaaluda ning kuivatada seda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu. Veemahutavuse saab seejärel arvutada järgmise valemiga:

$$\text{veemahutavus (protsentides kuivmassist)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100,$$

kus:

S on veega küllastunud substraadi mass + toru mass + filterpaberi mass;

T on tühimass (toru mass + filterpaberi mass);

D on substraadi kuivmass.

VIIDE

(1) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

▼M6

3. liide

Mulla pH määramine

Allpool kirjeldatud meetod mulla pH määramiseks põhineb kirjeldusel, mis on esitatud standardis ISO/DIS 10390 „Soil Quality – Determination of pH” (1).

Kindlaksmääratud mullakogusel lastakse toatemperatuuril vähemalt 12 tundi kuivada. Seejärel valmistatakse vähemalt 5 grammi mulda sisaldav suspensioon, kasutades 1 M analüütilise puhtusastmega kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M analüütilise puhtusastmega kaltsiumkloriidi ($CaCl_2$) lahust, mille maht on mulla mahust viis korda suurem. Suspensiooni loksutatakse põhjalikult viis minutit ja seejärel lastakse sellel settida vähemalt kaks tundi, kuid mitte kauem kui 24 tundi. Seejärel mõõdetakse vedela faasi pH väärtus pH-meetriga, mis kaliibritakse enne iga mõõtmist sobiva rea puhverlahustega (nt pH väärtustel 4,0 ja 7,0).

VIIDE

(1) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

▼M6

4. liide

***Eisenia fetida* / *Eisenia andrei* kasvatamine**

Usse tuleks soovitatavalt kasvatada kliimakambris temperatuuril 20 ± 2 °C. Sellel temperatuuril ja piisava sööda olemasolul saavutavad ussid suguküpsuse umbes 2–3 kuu pärast.

Kumbagi liiki võib kasvatada paljudes eri loomsetes jäätmetes. Soovitatav kasvukeskkond on hobuse- või veisesõnniku ja turba segu vahekorras 50:50. Tuleks kontrollida, et lehmadele või hobustele, kellelt sõnnik pärineb, ei manustata ussidele katse ajal kahjulikku mõju avaldada võivaid ravimeid ega kemikaale, näiteks kasvu soodustavaid aineid, nematotsiide või sarnaseid veterinaarravimeid. Soovitatakse kasutada oma kogutud mahesõnnikut, kuna kogemusest nähtub, et müügilolev aiaväetisena kasutatav sõnnik võib mõjuda ussidele kahjulikult. Kasvukeskkonna pH peaks olema umbes 6–7 (reguleeritakse kaltsiumkarbonaadiga), selle ioonjuhtivus peaks olema väike (väiksem kui 6 mS/cm või soolasisaldus väiksem kui 0,5 %) ja see ei tohiks olla ammoniaagi või loomade uriiniga liigselt saastunud. Substraat peaks olema niiske, kuid mitte liiga märg. Kasvatamiseks sobivad kastid mahuga 10–50 liitrit.

Standardse vanuse ja suurusega (kehamassiga) usside saamiseks on parim alustada kasvatamist kookonist. Kasvama pandud kultuuri säilitamiseks viiakse täiskasvanud ussid 14–28 päevaks värsket substraati sisaldavasse kasvatuskasti, et saada kookoneid juurde. Seejärel täiskasvanud ussid eemaldatakse ja kookonist kooruvaid noorloomi kasutatakse järgmise kultuuri saamiseks. Usse söödetakse pidevalt loomsete jäätmetega ja nad viiakse aeg-ajalt üle värskesse substraati. Kogemusest nähtub, et sobiv sööt on õhu käes kuivatatud peeneks jahvatatud lehma- või hobusesõnnik või kaerajahu. Tuleks veenduda, et lehmadele või hobustele, kellelt sõnnik pärineb, ei manustata ussidele pikaajalise kasvatamise käigus kahjulikku mõju avaldada võivaid ravimeid ega kemikaale, näiteks kasvu soodustavaid aineid. Kookonist koorunud usse kasutatakse katses 2–12 kuu vanusena, mil nad loetakse täiskasvanuks.

Usse võib pidada terveks, kui nad liiguvad läbi substraadi, ei püüa substraadist lahkuda ja paljunevad pidevalt. Substraadi ammendumisest annab märku usside väga aeglane liikumine ja nende tagaotsa muutumine kollaseks. Sellisel juhul soovitatakse kasutada värsket substraati ja/või vähendada asustustihedust.

▼M6

5. liide

Kookonist koorunud noorte usside loendamise meetodid

Usside käsitsi eemaldamine mullasubstraadist on väga aeganõudev. Seepärast soovitatakse kasutada ühte kahest järgmisest alternatiivsest meetodist.

a) Katsenõud asetatakse veevanni, mille temperatuur on algselt 40 °C, kuid tõuseb seejärel 60 °C-ni. Umbes 20 minuti pärast peaks noored ussid ilmuma mullapinnale, kust neid saab loendamiseks hõlpsalt eemaldada.

b) Katsemulla võib uhtuda läbi sõela meetodil, mille töötasid välja van Gestel *et al*. (1), kui mullale lisatud turvas ja sõnnik või kaerajahu on eelnevalt peeneks pulbriks jahvatatud. Kaks sõela läbimõõduga 30 cm ja ava suurusega 0,5 mm asetatakse teineteise peale. Katsenõu sisu uhutakse tugeva kraaniveejoaga läbi sõelte, nii et noored ussid ja kookonid jäävad enamjaolt ülemisele sõelale. On oluline tähele panna, et selle toimingu vältel tuleks kogu ülemise sõela pinda märjana hoida, et noored ussid jääksid veekihi pinnale ujuma ega saaks läbi sõelaavade ronida. Parimad tulemused saavutatakse dušiotsiku kasutamisel.

Kui kogu mullasubstraat on läbi sõela uhutud, saab noorloomad ja kookonid ülemiselt sõelalt kaussi uhtuda. Kausi sisu jäetakse seisma, et tühjad kookonid saaksid veepinnale tõusta ning täis kookonid ja noored ussid põhja vajuda. Seejärel saab seisva vee ära kallata ning tõsta noored ussid ja kookonid veidi vett sisaldavasse Petri tassi. Ussid võib loendamiseks eemaldada nõela või pintsettide abil.

Kogemusest nähtub, et meetod a sobib paremini selliste noorte usside ekstraheerimiseks, kes võidakse uhtuda isegi läbi 0,5 mm suuruste sõelaavade.

Mullasubstraadist usside (ja vajaduse korral kookonite) eemaldamiseks kasutatava meetodi tõhusus tuleks alati eelnevalt kindlaks teha. Kui noorloomad eemaldatakse käsitsi, on soovitatav teha seda toimingut igas kultuuris kaks korda.

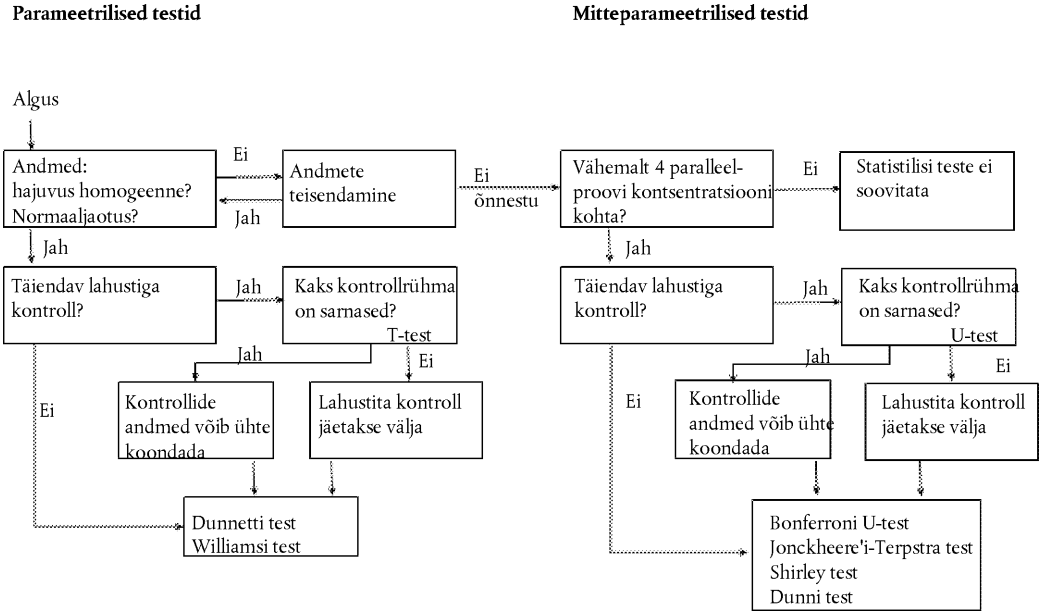
VIIDE

(1) Van Gestel, C. A. M., van Dis, W. A., van Breemen, E. M., ja Sparenburg, P. M. (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32: 367–371.

▼**M6**

6. liide

Andmete statistilise analüüsi ülevaade (täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramine)



▼M6

C.34. **ANAEROOBSETE BAKTERITE ELUTEGEVUSE PÄRSSUMISE MÄÄRAMINE – (REOVEE)SETTE KÄÄRIMISEGA KAASNEVA GAASIERITUSE VÄHENEMINE**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 224 (2007). Veekeskkonda sattunud kemikaalid läbivad nii aeroobse kui ka anaeroobse tsooni, kus need võidakse lagundada ja/või kus need võivad pärssida bakterite elutegevust; mõnel juhul võivad kemikaalid püsida anaeroobses tsoonis puutumatult aastakümneid või kauem. Reovee puhastamise esimeses ehk eelsetitusetapis on aeroobne tsoon vedelas supernatandis ja anaeroobne tsoon vedelikukihi all olevas settes. Sellele järgnevas teises etapis on aeroobne tsoon aereerimisbasseini aktiivmudas ja anaeroobne tsoon settebasseinis vedelikukihi all olevas settes. Kummastki etapist pärit muda tööldeldakse tavaliselt anaeroobselt; saadakse metaani ja süsihappegaasi, mida üldjuhul kasutatakse elektri tootmiseks. Looduskeskkonnas püsivad lahtedes, jõesuudmetes ja meres olevasse settesse jõudnud kemikaalid, mis ei ole biolagundatavad, selles anaeroobses tsoonis tõenäoliselt määramata aja. Mõne kemikaali puhul jõuab suurem osa sellest kõnealusesse tsooni tulenevalt kemikaali füüsikalistest omadustest – näiteks vähesest vees lahustuvusest või suurest hõljuvainele adsorbeerumise määrast – või asjaolust, et kemikaal ei ole aeroobselt biolagundatav.

2. Keskkonda sattuv kemikaal peaks soovitatavalt olema küll biolagundatav nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes, ent samal ajal on väga oluline, et selline kemikaal ei pärsiks mikroorganismide elutegevust kummaski tsoonis. Ühendkuningriigis on paaril juhul esinenud metaanitootmise täielikku pärssumist tööstuslikus reovees näiteks pentaklorofenooli toimel, mistõttu tuli teha väga suuri kulutusi, et pärssunud muda kääritusmahutitest ohutusse kohta transportida ja naaberkäitistest heas seisukorras kääritusmuda asemele tuua. On esinenud ka palju juhtumeid, kus kääritusprotsessi on väiksemal määral häirinud muud kemikaalid, sealhulgas alifaatsed halogeenitud süsivesinikud (kasutatakse keemilises puhastuses) ja detergendid, mis on põhjustanud kääritusmahutite tõhususe olulist vähenemist.

3. Bakterite elutegevuse pärssumisega on seotud vaid üks katsemeetod – aktiivmuda mikroorganismide hingamist käsitlev meetod C.11 (1), millega hinnatakse uuritava kemikaali mõju hapnikusidumise kiirusele substraadi juuresolekul. Seda meetodit on laialdaselt kasutatud selleks, et teha varakult kindlaks uuritava kemikaali võimalik kahjulik mõju reovee aeroobsele töötlemisele ja määrata kontsentratsioon, mille juures pärssumist ei toimu ja mida saab kasutada mitmes eri biolagunduvuse katses. Katsemeetod C.43 (2) loob piiratud võimaluse teha kindlaks uuritava kemikaali pärssiv mõju gaasitootmisele anaeroobses mudas, mida on tavapärases kontsentratsioonis tahkeid osakesi sisaldava mudaga võrreldes lahjendatud kümme korda, et võimaldada nõutavat täpsust biolagunemise protsentuaalse määra hindamisel. Kuna lahjendatud muda võib olla pärssivate kemikaalide suhtes tundlikum, otsustas Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni töörühm töötada välja meetodi, mille puhul kasutatakse lahjendamata muda. Tutvuti vähemalt kolme tekstiga (Taanist, Saksamaalt ja Ühendkuningriigist) ja lõpuks koostati kaks ISO standardit – ISO 13641-1 (3) ja ISO 13641-2 (4); neist esimese puhul kasutatakse lahjendamata muda ja teise puhul sajakordselt lahjendatud muda, mis vastab väikese bakterite populatsiooniga mudale ja settele. Kummagi meetodi valideerimiseks tehti võrdlusuuring (5); uuringu 1. osas kinnitati esimese standardi vastuvõetavust, kuid 2. osa suhtes tekkisid lahkarvamused. Ühendkuningriik leidis, et kuna märkimisväärse osa uuringus osalejate andmeil toodeti gaasi väga vähe või üldse mitte – osaliselt seepärast, et vabaruumi protsentuaalne maht oli optimaalse tundlikkuse saavutamiseks liiga suur (75 %) –, on vaja seda meetodit täiendavalt uurida.

4. Ühendkuningriigis tehtud varasemates uuringutes (6, 7) kirjeldatakse manomeetrilist meetodit, mille puhul on substraadina kasutatud lahjendamata käärivat muda ja lisaks töötlemata reoveesetet kolbides mahuga 500 ml; asjaomased seadmed olid kohmakad ja töötlemata reovee hais oli ülitugev. Hiljem leidsid rakendust Sheltoni ja Tiedje (8) kompaktsemad ja mugavamad seadmed, mida kasutasid Battersby ja Wilsoni (9) välja töötatud

▼M6

kujul edukalt Wilson *et al*. (10). Kawahara *et al*. (11) valmistasid laboris edukalt veel standardmuda proove mitme kemikaali anaeroobse biolagunduvuse ja pärssiva mõju hindamise katsetes kasutamiseks. Samuti tehti katse, milles kasutati töötlemata muda asemel substraadina kas sada korda lahjendatud anaeroobset muda või sellist muda, setet vmt, milles ei täheldatud bakterite aktiivset elutegevust.

5. Selle meetodi abil võib saada kasulikku teavet, mis võimaldab ennustada uuritava kemikaali tõenäolist mõju gaasitootmisele anaeroobsetes kääritusmahutites. Et hinnata, kas mikroorganismid on võimelised uuritava kemikaaliga kohanema või kas kemikaalid, mis tõenäoliselt mudas absorbeeruvad või mudaosakeste pinnale adsorbeeruvad, võivad käesolevas katses ette nähtust pikema perioodi vältel akumuleeruda kontsentratsioonis, mille puhul avaldub mürgine mõju, tuleks siiski teha pikemaajalisi katseid, milles jäljendatakse kääritusmahutite tööd täpsemalt.

KATSE PÕHIMÕTE

6. Käärivast mudast (tahkete osakeste üldsisaldus 20–40 g/l) ja lagundatava substraadi lahusest koosneva segu alikvoote inkubeeritakse suletud nõudes ilma kemikaalita või eri kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaaliga kuni 3 ööpäeva. Toodetud gaasi (metaani ja süsihappegaasi) koguse määramiseks mõõdetakse rõhu (Pa) suurenemist pudelites. Asjaomastes katse- ja kontrollpudelites toodetud gaasikoguste alusel arvutatakse uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel ilmneva gaasitootmise pärssumise protsentuaalne määr. EC_{50} ja muud mõju iseloomustamiseks määratavad kontsentratsioonid arvutatakse graafiku põhjal, mis väljendab pärssumise protsentuaalset määra sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsioonist või sagedamini selle logaritmist.

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

7. Üldjuhul tuleks uuritavat kemikaali kasutada puhtaimal kättesaadaval kujul, kuna mõne kemikaali, näiteks klorofenoolide puhul võivad lisandid olla palju mürgisemad kui uuritav kemikaal ise. Tuleks siiski kaaluda kemikaali kasutamist katses sellisel kujul, nagu seda toodetakse/müüakse. Valmistoodete kasutamist üldjuhul ei soovitata, kuid raskesti lahustuva uuritava kemikaali puhul võib valmistoote kasutamine olla asjakohane. Uuritava kemikaali kohta kättesaadav teave peaks hõlmama muu hulgas selliseid näitajaid nagu lahustuvus vees ja mõnes orgaanilises lahustis, aururõhk, adsorptsioonitegur, hüdrolüüsi kiirus ja biolagunduvus anaeroobsetes tingimustes.

MEETODI KASUTATAVUS

8. Käesolev katsemeetod on kasutatav nii vees lahustuvate kui ka vees lahustumatute, sealhulgas lenduvate kemikaalide puhul. Vees raskesti lahustuvate (vt allikas 12) ja suure lenduvusega kemikaalide puhul on siiski vaja olla eriti hoolikas. Võib kasutada ka muust anaeroobsest allikast, näiteks mudast, küllastunud mullast või settest pärit inokulumi. Mürgise kemikaaliga varem kokku puutunud anaeroobsete bakterite süsteemid võivad olla kohanenud nii, et bakterite elutegevus säilib ksenobiootilise kemikaali juuresolekul. Kohanenud bakterisüsteemist pärit inokulumi puhul võib taluvus uuritava kemikaali suhtes olla suurem kui kohanemata süsteemist pärit inokulumi puhul.

VÕRDLUSKEMIKAALID

9. Katsemeetodi kontrollimiseks hinnatakse tavapärase katse raames ka sobivatesse katsenõudesse lisatavat võrdluskemikaali; on leitud, et 3,5-diklorofenool pärsib järjepidevalt nii anaeroobset gaasitootmist kui ka hapnikutarbimist aktiivmudas ja muid biokeemilisi reaktsioone. Samuti on leitud, et kaks muud kemikaali – metüleenbis(tiotsüanaat) ja pentaklorofenool – pärsivad metaanitootmist rohkem kui 3,5-diklorofenool, kuid nende kemikaalidega saadud tulemused on valideerimata. Pentaklorofenooli ei soovitata kasutada, kuna see ei ole puhtal kujul hõlpsalt kättesaadav.

▼M6

TULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS

10. Rahvusvahelises võrdlusuuringus (5) täheldati, et 3,5-diklorofenooli ja 2-bromoetaansulfoonhappe puhul ei ole EC_{50} reprodutseeritavus uuringus osalenud 10 laboris kuigi hea. (Esimese kemikaali puhul oli kõnealune väärtuste vahemik 32–502 mg/l ja teise puhul 220–2 190 mg/l.)

Laborite arv	Milligrammides liitri kohta			Milligrammides muda grammi kohta		
	Keskmine	Standardhälve	Variatsioonikordaja (%)	Keskmine	Standardhälve	Variatsioonikordaja (%)
	3,5-diklorofenool					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bromoetaansulfoonhape					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC_{50} andmed võrdlusuuringust – lahjendamata muda

11. Eri laborites saadud tulemuste suur variatsioonikordaja kajastab suurel määral muda mikroorganismide erinevat tundlikkust, olenevalt varasemast kokkupuutest uuritava kemikaali või sellele keemiliselt sarnase kemikaaliga või sellise kokkupuute puudumisest. Muda kogusel põhineva EC_{50} väärtuse määramise täpsus ei olnud oluliselt suurem kui ruumalal põhineva väärtuse (mg/l) määramise täpsus. Kolmes laboris, kus esitati andmed 3,5-diklorofenooli EC_{50} väärtuse määramise täpsuse kohta, oli variatsioonikordaja palju väiksem (vastavalt 22, 9 ja 18 %) kui kõigi kümne labori tulemuste keskväärtuse puhul. Kõnealuses kolmes laboris saadud keskmine väärtus oli vastavalt 3,1, 3,2 ja 2,8 mg/g. Asjaolu, et ühes laboris saadud variatsioonikordaja väärtus on vastuvõetav ja palju väiksem kui eri laborites saadud tulemuste variatsioonikordaja ehk 92 % asemel 9–22 %, viitab sellele, et eri mudapartiidel on märkimisväärselt erinevad omadused.

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

12. Lisaks tavapärastele laboriseadmetele on vaja järgmist:

a) inkubaator – sädemekindel ja väärtusele 35 ± 2 °C reguleeritava temperatuuriga;

b) sobiva nimimahuga ([1]) survekindlad klaasist katsenõud, millel on gaasikindel pinnakattega tihendkork ja mis kannatavad rõhku umbes 2 baari ehk 2×10^5 Pa (pinnakattena võib kasutada näiteks polütetrafluoroetüleeni). Soovitatakse kasutada klaasist seerumipudeleid, mille nimimaht on 125 ml ja tegelik maht umbes 160 ml ning millel on seerumi jaoks ette nähtud tihendkork ([2]) ja alumiiniumist pressrõngas, kuid hästi sobivad ka muud pudelid üldmahuga 0,1–1 liitrit;

([1]) Soovitatav maht on 0,1–1 liitrit.

([2]) Soovitatakse kasutada gaasikindlat silikoonkorki. Peale selle on soovitatav kontrollida korgi, eriti butüülkummist korgi gaasikindlust, sest müügilolevad korgid ei ole mitmel juhul metaani suhtes piisavalt gaasikindlad ja mõni kork ei ole pärast sellest nõela läbitorkamist katsetingimustes enam gaasikindel.
- On soovitatav ja lenduvate kemikaalide puhul kohustuslik kasutada gaasikindlaid pinnakattega korke (mõni müügilolev kork on suhteliselt õhuke – paksusega alla 0,5 cm – ega säilita pärast sellest süstlanõela läbitorkamist gaasitihedust).
- Kui uuritav kemikaal ei ole lenduv, soovitatakse kasutada butüülkummist korki paksusega umbes 1 cm (see säilitab pärast nõela läbitorkamist tavaliselt gaasikindluse).
- Enne katset soovitatakse korki tähelepanelikult uurida, et veenduda, et see jääb pärast nõea läbitorkamist gaasikindlaks.

▼M6

c) täppisrõhumõõtur [1] koos nõelakinnitusega – toodetud gaasi (metaani ja süsihappegaasi) üldkoguse mõõtmiseks ja gaasi väljalaskmiseks kohandatud rõhumõõtur. Selleks sobiv seade on näiteks süstlanõelaga ühendatud käeshoitav täppisrõhumõõtur; gaasikindel kolmikventiil hõlbustab ülerõhust vabanemist (1. liide). Rõhuanduri toru ja ventiili siseruumala peab olema võimalikult väike, et seadme siseruumala arvestamata jätmisest tulenev viga oleks tühine;

d) soojusisolatsiooniga konteinerid kääriva muda transportimiseks;

e) kolmesuunalised rõhuventiilid;

f) sõel ava suurusega 1 mm^2;

g) nõu kääriva muda jaoks – umbes 5-liitrise mahuga klaasist või kõrgtihedast polüetüleenist pudel, mis on varustatud segistiga ja seadmetega gaasilise lämmastiku (vt punkt 13) juhtimiseks läbi vabaruumi;

h) membraanfiltrid (0,2 μm) substraadi steriliseerimiseks;

i) mikrosüstlad rõhuanduri (vt punkti 12 alapunkt c) gaasikindlaks ühendamiseks pudelis (vt punkti 12 alapunkt b) oleva vabaruumiga ja lahustumatu vedela uuritava kemikaali lisamiseks pudelisse;

j) kindakamber, mis töötab väikesel lämmastiku ülerõhul – soovitatav, kuid mitte kohustuslik.

Reaktiivid

13. Kogu katse vältel kasutatakse analüütilise puhtusastmega reaktiive. Kogu katse vältel tuleks kasutada kõrge puhtusastmega gaasilist lämmastikku, mille hapnikusisaldus on väiksem kui 5 μl/l.

Vesi

14. Lahjenduse tegemiseks mis tahes etapis kasutatakse eelnevalt desaereeritud deioniseeritud vett. Sellist vett ei ole vaja analüütiliselt kontrollida, kuid tuleb tagada, et deioniseerimisseadet hooldatakse korrapäraselt. Põhilahuste valmistamiseks kasutatakse samuti deioniseeritud vett. Enne anaeroobse inokulumi lisamist uuritava kemikaali mis tahes lahusele veendutakse, et lahus ei sisalda hapnikku. Selleks juhitakse 1 tunni vältel enne inokulumi lisamist läbi lahjendusvee (või lahjendatud lahuse) gaasilist lämmastikku või kuumutatakse lahjendusvett keemistemperatuurini ja jahutatakse hapnikuvabas keskkonnas toatemperatuurini.

Kääriv muda

15. Aktiivselt kääriv muda kogutakse reoveepuhasti kääritusmahutist või labori kääritusmahutist, kus töödeldakse peamiselt olmereoveest pärit muda. Praktiline teave labori kääritusmahutist pärit muda kohta on esitatud mujal (11). Kui kavatsetakse kasutada kohandatud inokulumi, võib kaaluda tööstuslikust reoveepuhastist pärit kääriva muda kasutamist. Muda kogumiseks kasutatakse kõrgtihedast polüetüleenist või sarnasest materjalist laia kaelaga pudeleid, mis on võimelised paisuma. Proovivõtupudelid täidetakse mudaga nii,

[1] Mõõturit tuleks kasutada ja korrapäraselt kaliibrida vastavalt tootja juhistele. Kui kasutatakse ettenähtud kvaliteediga rõhumõõturit, näiteks teraskesta suletud mõõturit, ei ole laboris kaliibrimine vajalik. Sellist mõõturit tuleks soovitatava intervalliga kaliibrida vastava loa saanud instituudis. Kaliibrimistäpsust saab laboris kontrollida ühe mõõtmisega rõhul 1×10^5 Pa, võrreldes saadud tulemust mehaanilise näidikuga rõhumõõturi näiduga. Kui kõnealune mõõtmine tehakse õigesti, ei muutu ka mõõtetulemuste lineaarsus. Kui kasutatakse muud mõõteseadet, millel puudub tootja kaliibrimissertifikaat, soovitatakse koostada korrapäraselt kogu mõõtepiirkonda hõlmav teisendusgraafik (2. liide).

▼M6

et mudapind jääb pudelisuust umbes 1 cm võrra allapoole, pudelid suletakse tihedalt, kasutades soovitatavalt kaitseventiili (punkti 12 alapunkt e), ning paigutatakse soojusisolatsiooniga konteineritesse (punkti 12 alapunkt d), et minimeerida temperatuurišokki transportimisel temperatuuril 35 ± 2 °C hoitavasse inkubaatorisse. Pudelite avamisel tuleb ülerõhku tekitava gaasi väljalaskmiseks kork ettevaatlikult lahti teha või kasutada kolmesuunalist rõhuventiili (punkti 12 alapunkt e). Soovitatav on kasutada muda mõne tunni jooksul pärast kogumist; vastasel juhul säilitatakse muda temperatuuril 35 ± 2 °C kuni 3 ööpäeva gaasilise lämmastiku all, kus muda aktiivsus tavaliselt oluliselt ei vähene.

Hoiatus – käärivas mudas tekivad tule- ja plahvatusohtlikud gaasid ning samuti võib see sisaldada patogeenseid organisme, mistõttu tuleb muda käsitsemisel võtta asjakohased ettevaatusabinõud. Ohutuse huvides ei kasutata muda kogumiseks klaasnõusid.

Inokulum

16. Vahetult enne kasutamist segatakse muda ettevaatlikult ning lastakse läbi 1 mm^2 suuruste avadega sõela (punkti 12 alapunkt f) sobivasse pudelisse (punkti 12 alapunkt g), mille vabaruumist juhitakse läbi lämmastikujuga. Võetakse proov tahke kuivaine üldsisalduse määramiseks (vt nt ISO 11923 (13) või samaväärne ELi standard). Muda kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul. Tahke aine sisaldus on tavaliselt 2–4 % (massiühikutes mahuühiku kohta). Kontrollitakse muda pH-d ja reguleeritakse see vajaduse korral tasemele 7 ± 0,5 ühikut.

Katsesubstraat

17. 10 g toitepuljongit (nt Oxoid), 10 g pärmiekstrakti ja 10 g D-glükoosi lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse 100 milliliitrini. Lahus steriliseeritakse filtrimisega läbi 0,2 μm suuruste pooridega membraanfiltri (punkti 12 alapunkt h) ja seda kasutatakse kohe või säilitatakse 4 °C juures kuni 1 ööpäev.

Uuritav kemikaal

18. Valmistatakse eraldi iga vees lahustuva uuritava kemikaali põhilahus, mille kemikaalisisaldus hapnikuvabas lahjendusvees (punkt 14) on näiteks 10 g/l. Eri kontsentratsiooniga reaktsioonisegude valmistamiseks kasutatakse sobivas koguses sellist põhilahust. Teise võimalusena valmistatakse igast põhilahusest lahjenduste seeria, nii et katsepudelisse lisatav kogus on iga soovitud lõppkontsentratsiooni puhul sama. Põhilahuse pH tuleks vajaduse korral reguleerida tasemele 7 ± 0,2 ühikut.

19. Kui uuritav kemikaal ei ole piisaval määral vees lahustuv, juhindutakse standardist ISO 10634 (12) või samaväärsest ELi standardist. Kui on vaja kasutada orgaanilist lahustit, hoidutakse kasutamast näiteks kloroformi ja süsiniktetrakloriidi, mis teadaolevalt pärsivad tugevalt metaanitootmist. Valmistatakse vees lahustumatu kemikaali vajaliku kontsentratsiooniga lahus sobivas lenduvas lahustis, näiteks atsetoonis või dietüüleetris. Nõutav kogus lahustipõhist lahust lisatakse tühja katsepudelisse (punkti 12 alapunkt b) ja lahustil lastakse enne muda lisamist aurustuda. Muul viisil töötlemise puhul kasutatakse standardit ISO 10634 (12) või samaväärset ELi standardit, ent tuleb meeles pidada, et emulgeerimiseks kasutatav pindaktiivne aine võib pärssida anaeroobset gaasitootmist. Kui on alust arvata, et orgaanilise lahusti või emulgeeriva aine juuresolek põhjustab katsevigu, võib uuritava kemikaali lisada pulbri või vedeliku kujul otse katsesegusse. Lenduvad kemikaalid ja vees lahustumatud vedelad uuritavad kemikaalid võib süstida inokulumi sisaldavasse seerumipudelisse mikrosüstla abil (punkti 12 alapunkt i).

▼M6

20. Uuritav kemikaal lisatakse pudelitesse nii, et moodustuks kontsentratsioonide geomeetriline jada – näiteks 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l ja 15,6 mg/l. Kui vahemik, milles mürgisus avaldub, ei ole sarnaste kemikaalide andmetest teada, tehakse sobiva vahemiku kindlakstegemiseks esmalt kontsentratsioonivahemiku leidmise eelkatse kontsentratsioonidel 1 000 mg/l, 100 mg/l ja 10 mg/l.

Võrdluskemikaal

21. Valmistatakse 3,5-diklorofenooli vesilahus (10 g/l), lisades tahkele ainele loksutades vähehaaval minimaalse koguse naatriumhüdroksiidi lahust kontsentratsiooniga 5 mol/l, kuni aine on lahustunud. Seejärel lisatakse vajaliku ruumala saavutamiseks hapnikuvaba lahjendusvett (punkt 14); lahustumist võib hõlbustada ultraheliga töötlemine. Võib kasutada ka muud võrdluskemikaali, kui vähemalt kolme katse põhjal, mis on tehtud eri allikatest pärit või eri aegadel kogutud inokulumidega, on leitud selle kemikaali EC_{50} väärtuste keskmine vahemik.

SEGAVAD ASJAOLUD / VEAD

22. Mõni muda koostisosa võib eeldatavalt reageerida võimaliku pärssiva kemikaaliga, muutes selle mikroorganismidele kättesaamatuks ja tuues seeläbi kaasa pärssiva mõju vähenemise või puudumise. Samuti võidakse saada valed tulemused, kui muda juba sisaldab sama pärssivat kemikaali, mida katses uuritakse. Peale nimetatud võimaluste on teada veel mitu tegurit, millest tulenevalt võidakse saada valed tulemused. Need tegurid ja neist tingitud vigade ärahoidmise või vähendamise meetodid on loetletud 3. liites.

KATSE KÄIK

23. Vajalike paralleelproovide arv sõltub nõutavast täpsusastmest pärssiva mõju määramisel. Kui pudelikork on kogu katse vältel piisavalt gaasikindel, kasutatakse iga vajaliku kontsentratsiooni puhul ainult ühte katsepudelite partiid (vähemalt kolm pudelit). Samuti kasutatakse ühte partiid võrdluskemikaaliga pudeleid ja ühte kontrollpartiid. Kui aga pudelikork on gaasikindel vaid ühe või paari läbitorkamise puhul, kasutatakse uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil ühte partiid (nt kolm pudelit) iga ajavahemiku (t) jaoks, mille kohta soovitakse andmeid saada. Samamoodi kasutatakse t väärtuste arvule vastaval arvul pudelipartiisid võrdluskemikaaliga rühmas ja kontrollrühmas.

24. On soovitatav kasutada kindakambrit (punkti 12 alapunkt j). Vähemalt 30 minutit enne katse algust alustatakse gaasilise lämmastiku juhtimist läbi kõiki vajalikke seadmeid sisaldava kindakambri. Tagatakse, et muda temperatuur jääb pudelite käsitsemise ja sulgemise ajal vahemikku 35 ± 2 °C.

Eelkatse

25. Kui muda aktiivsus ei ole teada, soovitatakse teha eelkatse. Selleks kasutatakse kontrollsegusid, kus tahke aine sisaldus on näiteks 10 g/l, 20 g/l ja 40 g/l ning mis sisaldavad substraati, kuid mitte uuritavat kemikaali. Samuti kasutatakse reaktsioonisegu eri kogustes, et võrrelda tulemusi vabaruumi mahu ja vedeliku mahu suhtarvu kolmel või neljal eri väärtusel. Eri ajavahemike vältel toodetud gaasikoguste põhjal valitakse välja sobivaimad tingimused, mis võimaldavad toota märkimisväärses koguses gaasi ja teha kaks mõõtmist päevas optimaalse tundlikkusega ([1]) ning alandada igapäevaselt rõhku plahvatusohtu tekitamata.

Uuritava kemikaali lisamine

26. Vees lahustuv kemikaal lisatakse tühja katsepudelisse (punkti 12 alapunkt b) vesilahusena (punkt 18). Iga kontsentratsiooni puhul (punkt 20) kasutatakse vähemalt kolmest pudelist koosnevat partiid. Lahustumatu või raskesti lahustuva kemikaali puhul süstitakse see mikrosüstlaga orgaanilises lahustis

([1]) See kehtib katsesüsteemis ja katsetingimustes, mille puhul gaasikoguseid, mida toodetakse kemikaalita kontrollnõudes ja nõudes, kus pärssumise määr on 70–80 %, on võimalik hinnata vastuvõetava veamääraga.

▼M6

lahustatud kujul tühjadesse pudelitesse, et saada uuritava kemikaali kõigil viiel kontsentratsioonil partii paralleelpudeleid. Lahusti aurustatakse, juhtides gaasilise lämmastiku joa üle katsepudelis oleva lahuse pinna. Teise võimalusena lisatakse kaalutud kogus tahket kemikaali otse katsepudelisse.

27. Kui lahustumatu või raskesti lahustuva vedela uuritava kemikaali lisamiseks ei kasutata lahustit, lisatakse see mikrosüstla abil otse katsepudelisse pärast inokulumi ja katsesubstraadi lisamist (vt punkt 30). Lenduva uuritava kemikaali võib lisada samal viisil.

Inokulumi ja substraadi lisamine

28. Vajalik kogus sõelutud käärivat muda (vt punkt 16) segatakse 5-liitrises pudelis (punkti 12 alapunkt g), juhtides samal ajal gaasilist lämmastikku joana läbi pudeli vabaruumi. Uuritava kemikaali vesilahust või aurustatud lahustiga saadud lahust sisaldavatesse katsepudelitesse suunatakse õhu eemaldamiseks umbes kaheks minutiks gaasilise lämmastiku juga. Hästi segatud muda alikvoot, nt 100 ml, viiakse laiaotsalise pipeti või mõõtesilindri abil katsepudelisse. On oluline täita pipett ühekorraga täpselt vajaliku koguse mudaga, sest muda tahked osakesed settivad kergesti. Kui pipetti võetakse vajalikust suurem kogus, tühjendatakse pipett ja alustatakse uuesti.

29. Seejärel lisatakse piisavas koguses substraadi lahust (punkt 17), et toitepuljongi, pärmiekstrakti ja D-glükoosi sisaldus saadavas segus oleks iga nimetatud koostisosa puhul 2 g/l; samal ajal jätkatakse lämmastiku juhtimist läbi pudeli. Allpool on esitatud näited katsesegu koostise kohta.

Uuritava kemikaali lõplik massikontsentratsioon katsepudelis (mg/l)	Uuritava kemikaali kogus (ml)		Reaktiivid ja segu koostisosad (ml)		
	Põhilahus a: 10 g/l (punkt 18)	Põhilahus b: 1 g/l (punkt 18)	Lahjendusvesi (punkt 14)	Inokulum (punkt 16)	Substraat (punkt 17)
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Pudeli üldmaht – 160 ml. Vedeliku ruumala – 103 ml.
Gaasi ruumala – 57 ml ehk 35,6 % üldmahust.

30. Lenduva või lahustumatu vedela uuritava kemikaali (vt punkt 27) jaoks ette nähtud piisavast arvust tühjadest pudelitest eemaldatakse õhk samal viisil gaasilise lämmastikuga.

▼M6

Kontrollproovid ja võrdluskemikaal

31. Kontrollrühm moodustatakse vähemalt kolmest pudelist, mis sisaldavad üksnes muda ja substraati. Peale selle kasutatakse katses paralleelpudeleid, mis sisaldavad lisaks mudale ja substraadile piisavas koguses võrdluskemikaali 3,5-diklorofenooli põhilahust (punkt 21), et saavutada lõppkontsentratsioon 150 mg/l. Sellel kontsentratsioonil peaks gaasitootmise pärssumise määr olema umbes 50 %. Teise võimalusena kasutatakse võrdluskemikaali mitmes eri kontsentratsioonis. Lisaks kasutatakse katses pH määramiseks veel nelja pudelit, mis sisaldavad muda, hapnikuvaba vett ja substraati. Kahte pudelisse lisatakse uuritavat kemikaali katses kasutatavas suurimas kontsentratsioonis ja ülejäänud kahte pudelisse lisatakse hapnikuvaba vett.

32. Veendutakse, et kõik uuritava kemikaaliga, võrdluskemikaaliga või kontrollseguga pudelid sisaldavad samas koguses (V_R) vedelikku; vajaduse korral lisatakse vedelikumahu suurendamiseks hapnikuvaba deioniseeritud vett (punkt 14). Vabaruum peaks moodustama 10–40 % pudeli üldmahust; selle täpne väärtus valitakse eelkatsest saadud andmete põhjal. Pärast kõikide koostisosade lisamist pudelisse eemaldatakse gaasi juhtimiseks kasutatud nõel ja kõik pudelid suletakse kummikorgi ja alumiiniumist pressrõngaga (punkti 12 alapunkt b), niisutades korki paigaldamise hõlbustamiseks tilga deioniseeritud veega. Iga pudeli sisu segatakse loksutamise teel.

Pudelite inkubeerimine

33. Pudelid paigutatakse reguleeritava temperatuuriga inkubaatorisse, mis on soovitatavalt varustatud loksutamisseadmega, ja neid hoitakse temperatuuril 35 ± 2 °C. Pudeleid inkubeeritakse pimedas. Umbes 1 tunni pärast võrdsustatakse rõhk pudelites atmosfäärirõhuga, torgates rõhumõõturiga (punkti 12 alapunkt c) ühendatud süstlanõela ükshaaval läbi iga pudeli korgi, avades ventiili ja sulgedes selle taas pärast rõhumõõturi näidu langemist nulli. Nõel tuleks gaasi lekkimise ärahoidmiseks sisestada pudelisse umbes 45-kraadise nurga all. Kui pudelite inkubeerimisel ei kasutata loksutamisseadet, loksutatakse pudeleid süsteemi tasakaalustamiseks käsitsi kaks korda päevas kogu inkubeerimisperioodi vältel. Pudelite inkubeerimisel pööratakse need tagurpidi, et hoida ära gaasi lekkimist läbi korgi. Tagurpidi pööramine ei ole siiski sobiv juhtudel, kus lahustumatu kemikaal võib pudeli põhja külge kinni jääda.

Rõhu mõõtmine

34. Kui temperatuur pudelites on saavutanud väärtuse 35 ± 2 °C, mõõdetakse ja registreeritakse pH kahes neljast selleks ette nähtud pudelist ning nende pudelite sisu kõrvaldatakse; ülejäänud pudeleid inkubeeritakse pimedas edasi. Rõhku pudelites mõõdetakse ja registreeritakse järgneva 48–72 tunni jooksul kaks korda päevas, torgates rõhumõõturi nõela ükshaaval läbi iga pudeli korgi ja kuivatades nõela pärast iga mõõtmist. Pudeli kõiki osi hoitakse mõõtmise ajal inkubeerimistemperatuuril ja mõõtmine tuleks lõpule viia võimalikult kiiresti. Rõhunäidul lastakse stabiliseeruda ja see registreeritakse. Seejärel avatakse ventiil gaasi väljalaskmiseks ja suletakse see pärast rõhunäidu langemist nulli. Katse tavapärane kestus on 48 tundi alates rõhu esmakordse võrdsustamise hetkest ehk aja nullpunktist. Lenduva kemikaali puhul tuleks kemikaali kao minimeerimiseks piirduda rõhu mõõtmise ja võrdsustamisega ühel korral (inkubeerimise lõppedes) või kahel korral (10).

35. Kui rõhunäit on negatiivne, siis ventiili ei avata. Mõnikord koguneb süstlanõela ja voolikusse niiskust, millest annab märku väike negatiivne rõhunäit. Sellisel juhul eemaldatakse nõel, raputatakse voolikut, kuivatatakse see pehmepaberiga ja paigaldatakse uus nõel.

pH mõõtmine

36. Pärast viimast rõhu mõõtmist mõõdetakse ja registreeritakse iga pudeli sisu pH.

▼M6

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste esitamine

37. Iga paralleelpudelite partii puhul arvutatakse igal mõõtmiskorral registreeritud rõhu keskväärtus ja summaarne rõhk ning gaasi keskmine kumulatiivne kogurõhk. Koostatakse keskmise kumulatiivse gaasitoodangu (Pa) ajast sõltuvuse kõverad kontrollproovide, uuritava kemikaaliga proovide ja võrdluskemikaaliga proovide kohta. Kõvera lineaarses osas valitakse üks ajapunkt – tavaliselt 48 tundi – ja arvutatakse pärssumise protsentuaalne määr (I) igal kontsentratsioonil vastavalt järgmisele võrrandile:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

kus

I on pärssumise protsentuaalne määr,

P_t on valitud ajahetkeks uuritava kemikaali juuresolekul toodetud gaasi rõhk paskalites (Pa) ja

P_c on samaks ajahetkeks kontrollrühmas toodetud gaasi rõhk paskalites (Pa).

On soovitatav koostada kaks kõverat, millest üks väljendab I sõltuvust kontsentratsioonist ja teine I sõltuvust kontsentratsiooni logaritmist, ning valida neist lineaarsele sõltuvusele lähedasem kõver. Valitud kõvera põhjal määratakse visuaalselt või regressioonanalüüsi teel EC_{50} hinnanguline väärtus (mg/l). Võrdlemise hõlbustamiseks võib olla otstarbekam väljendada kemikaali kontsentratsiooni milligrammides kuivaine üldmassi grammi kohta. Sellise kontsentratsiooni saamiseks jagatakse kemikaali massikontsentratsioon (mg/l) muda kuivaine massikontsentratsiooniga (g/l) (punkt 16).

38. Arvutatakse kas pärssumise protsentuaalne määr võrdluskemikaali ainsal kasutatud kontsentratsioonil või piisava arvu kontsentratsioonide kasutamise korral EC_{50}.

39. Kontrollrühmas toodetud gaasi keskmine rõhk P_c (Pa) teisendatakse rõhumõõturi kaliibrimiskõvera alusel (2. liide) ruumalaks ja selle põhjal arvutatakse gaasisaagis, mida väljendatakse gaasi mahuna, mis on toodetud 48 tunni jooksul 100 ml lahjendamata mudast, mille tahke aine sisaldus on 2–4 % (20–40 g/l).

Nõuetekohasuse kriteeriumid

40. Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni laboritevahelise uuringu (5) tulemustest nähtub, et võrdluskemikaal (3,5-diklorofenool) pärsib gaasitootmist 50 % võrra kontsentratsioonivahemikus 32–510 mg/l keskväärtusega 153 mg/l (punkt 10). See vahemik on nii lai, et nõuetekohasuse kriteeriumidena ei ole võimalik kehtestada pärssiva mõju usaldusväärseid piirmäärasid; see peaks saama võimalikuks, kui leitakse viis, kuidas muuta inokulumid ühetaolisemaks. Kontrollpudelites 48 tunni jooksul toodetud gaasi kogus jäi vahemikku 21–149 ml muda kuivaine grammi kohta (keskmine: 72 ml/g). Ei täheldatud selget seost toodetud gaasikoguse ja asjaomase EC_{50} väärtuse vahel. Katse lõpus mõõdetud pH jäi vahemikku 6,1–7,5.

41. Katse loetakse nõuetekohaseks, kui võrdluskemikaaliga rühmas, kus 3,5-diklorofenooli kontsentratsioon on 150 mg/l, on pärssumise määr üle 20 %, kemikaalita kontrollrühmas toodetakse üle 50 ml gaasi kuivaine grammi kohta ning pH väärtus jääb katse lõpus vahemikku 6,2–7,5.

Katseprotokoll

42. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

▼M6

— uuritava kemikaali puhtus (lisandid).

Katsetingimused:

— katsenõudes oleva vedeliku ja vabaruumi maht;

— katsenõude ja gaasimõõteseadme kirjeldus (nt rõhumõõturi tüüp);

— teave uuritava kemikaali ja võrdluskemikaali lisamise kohta katsesüsteemi, katses kasutatud kontsentratsioonide kohta ja lahustite kasutamise kohta;

— kasutatud inokulumi üksikasjalikud andmed: reoveepuhasti nimi, töödeldava reovee päritolu kirjeldus (nt töötemperatuur, muda retentsiooniaeg, kas tegemist on peamiselt olmereovee või tööstusliku reoveega jne), tahke aine sisaldus, gaasitootmise intensiivsus anaeroobses kääritusmahutis, varasem kokkupuude või võimalik eelnev kohanemine mürgiste kemikaalidega, muda või sette võtmise koht jne;

— inkubeerimise temperatuur ja kestus;

— paralleelproovide arv.

Tulemused:

— pH väärtus katse lõpus;

— kõik asjakohased katsenõudest, kemikaalita kontrollnõudest ja võrdluskemikaaliga nõudest saadud mõõteandmed (nt rõhk paskalites või millibaarides) tabeli kujul;

— pärssumise protsentuaalne määr katsepudelites ja võrdluskemikaaliga pudelites ning pärssumise määra ja kontsentratsiooni vahelise sõltuvuse kõverad;

— arvutatud EC_{50} väärtused, väljendatuna kujul mg/l ja mg/g;

— gaasitoodang muda grammi kohta 48 tunni jooksul;

— iga katsetulemuste arvestamata jätmise põhjendus;

— tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse kõiki kõrvalekaldeid käesolevast katsemeetodist ning kõiki segavatest asjaoludest ja vigadest tulenevaid kõrvalekaldeid eeldatavatest katsetulemustest;

— teave selle kohta, kas katse eesmärk oli mõõta mürgisust kemikaaliga varem kokku puutunud mikroorganismidele või sellega varem mitte kokku puutunud mikroorganismidele.

KIRJANDUS

(1) Käesoleva lisa peatükk C.11 „Aktiivmuda mikroorganismide hingamise (süsiniku ja ammooniumi oksüdeerimise) pärssimise katse”.

(2) Käesoleva lisa peatükk C.43 „Orgaaniliste ainete anaeroobne biolagunevus läbikäärinud mudas: mõõtmine gaasi eraldumise järgi”.

(3) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (2003). ISO 13641-1: Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

(4) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (2003). ISO 13641-2: Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (2000). Ring test of ISO 13641-1 and ISO 13641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans, M. R., ja Painter, H. A. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham TQ5 8BA, Ühendkuningriik.

▼**M6**

(6) Swanwick, J. D., ja Foulkes, M. (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Water Pollut. Control* 70: 58–70.

(7) HMSO (1986). Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X. Väljaandes: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. Ühendkuningriik.

(8) Shelton, D. R., ja Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microb*. 47: 850–857.

(9) Battersby, N. S., ja Wilson, V. (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17: 2441–2460.

(10) Wilson, V., Painter, H. A., ja Battersby, N. S. (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. International Symposium on Ecotoxicology. Proceedings: Ecotoxicological Relevance of Test Methods; November 19-20, 1990, GSF-Forschungzentrum Neuherberg. Saksamaa. Toim. Steinberg, C., ja Kettrup, A. Lk 117–132 (1992).

(11) Kawahara, K., Yakabe, Y., Chida, T., ja Kida, K. (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere* 39: 2007–2018.

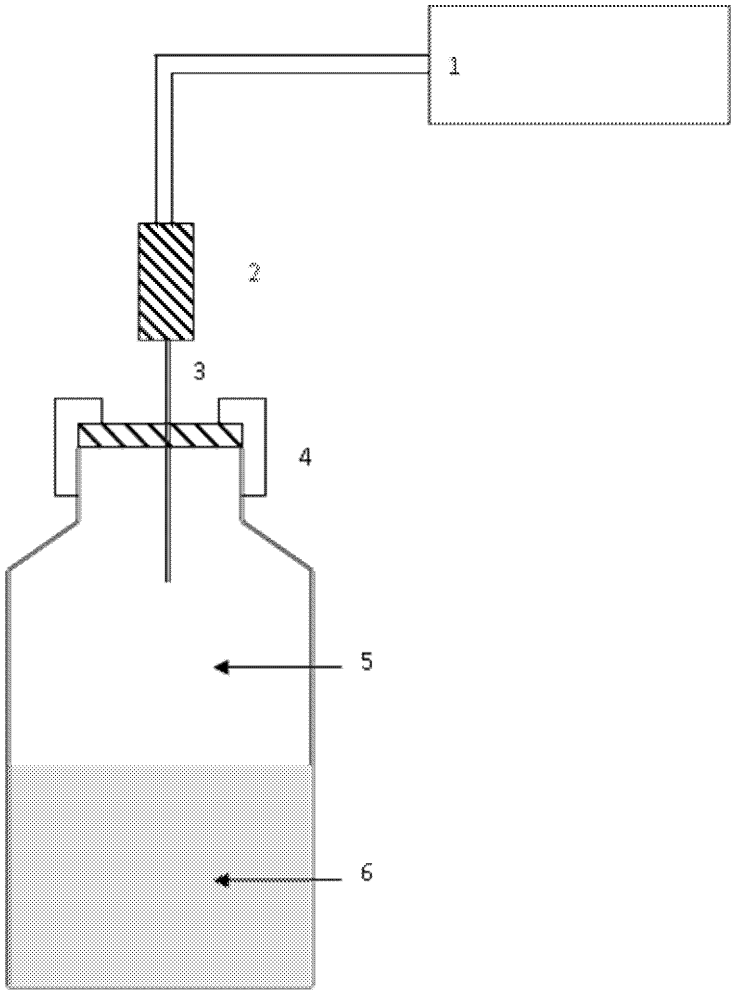
(12) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1995). ISO 10634: Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1997). ISO 11923: Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

1. liide

Näide seadme kohta, millega mõõdetakse gaasirõhku toodetava biogaasi koguse määramiseks



Selgitus:

1 – rõhumõõtur

2 – gaasikindel kolmikventiil

3 – süstlanõel

4 – gaasikindel kork (pressrõngas ja tihendkork)

5 – vabaruum

6 – kääriva muda inokulum

Katsenõusid hoitakse temperatuuril 35 ± 2 °C.

▼M6

2. liide

Rõhumõõturi näidu teisendamine

Rõhumõõturi näidu põhjal gaasikoguse arvutamiseks võib kasutada standardkõverat, mille alusel leitakse muda kuivaine grammi kohta 48 tunni jooksul toodetud gaasi kogus. Seda muda aktiivsuse näitajat kasutatakse ühe kriteeriumina katsetulemuste nõuetekohasuse hindamisel. Kaliibrimiskõvera koostamiseks süstitakse teadaolev kogus gaasi temperatuuril 35 ± 2 °C seerumipudelisse, mis sisaldab reaktsioonisegu ruumalale (V_R) vastavas koguses vett.

— Viide seerumipudelisse viiakse temperatuuril 35 ± 2 °C hoitava vee alikvoot ruumalaga V_R (ml). Pudelid suletakse ja paigutatakse tasakaalustamiseks 1 tunniks veevanni, mille temperatuur on 35 ± 2 °C.

— Rõhumõõtur pannakse tööle, näidul lastakse stabiliseeruda ja see reguleeritakse nulli.

— Süstlanõel torgatakse läbi ühe pudeli korgi, avatakse ventiil ja suletakse see pärast rõhumõõturi näidu langemist nulli.

— Seda toimingut korratakse ülejäänud pudelitega.

— Igasse pudelisse süstitakse 1 ml õhku temperatuuriga 35 ± 2 °C. Mõõturiga ühendatud nõel torgatakse läbi ühe pudeli korgi ja rõhunäidul lastakse stabiliseeruda. Registreeritakse rõhu väärtus, avatakse ventiil ja suletakse see pärast rõhunäidu langemist nulli.

— Seda toimingut korratakse ülejäänud pudelitega.

— Kõiki kirjeldatud toiminguid korratakse, kasutades 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ja 50 ml õhku.

— Koostatakse rõhu (Pa) ja lisatud gaasikoguse (ml) vahelist sõltuvust väljendav teisendusgraafik. Seadme näidu sõltuvus gaasikogusest on lineaarne vahemikus 0–70 000 Pa ja toodetud gaasikoguste vahemikus 0–50 ml.

▼M6

3. liide

Valesid tulemusi põhjustada võivad teadaolevad tegurid

a) *Pudelikorkide kvaliteet*

Seerumipudelite jaoks on müügil eri tüüpi tihendkorke; paljud neist – sealhulgas butüülkummist korgid – kaotavad käesoleva katsemeetodi kohastes tingimustes pärast nõelaga läbitorkamist oma gaasikindluse. Mõnikord langeb rõhk pärast süstlanõela korgist läbi torkamist väga aeglaselt. Lekete ärahoidmiseks soovitatakse kasutada gaasikindlaid tihendkorke (punkti 12 alapunkt b).

b) *Niiskus süstlanõelas*

Mõnikord koguneb süstlanõela ja voolikusse niiskust, millest annab märku väike negatiivne rõhunäit. Olukorra parandamiseks eemaldatakse nõel, raputatakse voolikut, kuivatatakse see pehmepaberiga ja paigaldatakse uus nõel (punkti 12 alapunkt c ja punkt 35).

c) *Hapnikuga saastumine*

Anaeroobseid protsesse käsitlevate meetoditega võidakse saada valed tulemused hapnikuga saastumise tõttu, mille tagajärjel võib gaasitootmine väheneda. Käesoleva katsemeetodi puhul peaks see võimalus olema väga väike, kuna kasutatakse üksnes anaeroobsete protsesside jaoks ette nähtud metoodikat, sealhulgas kindakambrit.

d) *Mudas sisalduvad suuremõõtmelised substraadid*

Anaeroobset gaasitootmist ja muda tundlikkust mõjutavad koos inokulumiga katsepudelisse viidavad substraadid. Olmereovee kääritusmahutitest pärit kääriv muda sisaldab sageli veel äratuntavaid koostisosi, näiteks juukseid ja tselluloosist koosnevaid taimejääke, mis võivad muuta representatiivse proovi võtmise raskeks. Mudas leiduvad suured lahustumatud koostisosad saab kõrvaldada sõelumise teel, mis suurendab representatiivsete proovide saamise tõenäosust (punkt 16).

e) *Lenduv uuritav kemikaal*

Lenduv uuritav kemikaal koguneb katsepudeli vabaruumi. See võib kaasa tuua uuritava kemikaali osalise kao süsteemist rõhu mõõtmisele järgneva gaasi väljalaskmise ajal ning sellest tuleneva EC_{50} väärtuse ülehindamise. Kõnealust viga on võimalik vähendada, kui valitakse sobiv vabaruumi mahu ja vedelikumahu suhe ega lasta pärast rõhu mõõtmist gaasi välja (10).

f) *Toodetava gaasikoguse mittelineaarne suurenemine*

Kui kõver, mis väljendab keskmise kumulatiivse toodetud gaasikoguse sõltuvust inkubeerimisajast, ei ole 48 tunni pikkuse perioodi lõikes üldjoontes lineaarne, võib katsetulemuste täpsus väheneda. Selle ärahoidmiseks võib abi olla erinevast allikast pärit kääriva muda kasutamisest ja/või toitepuljongit, pärmiekstrakti ja glükoosi sisaldava katsesubstraadi (punkt 29) sisalduse suurendamisest.

▼M6

4. liide

Mõju hindamine väikese biomassisisaldusega keskkonnaproovide – anaeroobse muda, sette jmt – puhul

SISSEJUHATUS

A.1. Üldjuhul on mikroobide eriaktiivsus (tahke aine kuivmassi grammi kohta toodetava gaasi kogus) loodusliku anaeroobse muda, sette, mulla jmt puhul palju väiksem kui reoveest pärit anaeroobse muda puhul. Sellest tulenevalt on vaja sellistele väiksema aktiivsusega proovidele avalduva kemikaalide pärssiva mõju hindamiseks teatavaid katsetingimusi muuta. Kõnealuste väiksema aktiivsusega proovide puhul on võimalik kasutada ühte kahest üldisest lähenemisviisist:

a) teha muudetud kujul eelkatse (punkt 25) lahjendamata mudaproovi, mullaproovi vmt-ga temperatuuril 35 ± 2 °C või keskkonnatingimuste täpsemaks jäljendamiseks proovi kogumiskohas valitseval temperatuuril (nagu on kirjeldatud standardi ISO 13641 1. osas);

b) teha katse kääritusmahutist pärit sajakordselt lahjendatud reoveemudaga, et jäljendada keskkonnaproovi eeldatavalt väikest aktiivsust, ent hoida temperatuuri väärtusel 35 ± 2 °C (nagu on kirjeldatud standardi ISO 13 641 2. osas).

A.2. Valiku a puhul võib järgida siin kirjeldatud meetodit (mis on samaväärne standardi ISO 13641 1. osaga), kuid on oluline teha eelkatse (punkt 25) optimaalsete tingimuste kindlakstegemiseks, kui need ei ole varasematest katsetest juba teada. Muda- või setteproov tuleks näiteks segisti abil põhjalikult läbi segada ning lahjendada seda vajaduse korral väikese koguse desaereeritud lahjendusveega (punkt 14), et muuta see laiaotsalise pipeti või mõõtesilindriga ülekandmiseks piisavalt vedelaks. Kui leitakse, et toitaineid on liiga vähe, võib mudaproovi tsentrifuugida (anaeroobsetes tingimustes) ja suspendeerida selle uuesti pärmiekstrakti sisaldavas mineraalses toitelahuses (A.11).

A.3. Valik b. Selle valiku puhul jäljendatakse piisavalt hästi keskkonnaproovide väikest aktiivsust, saavutamata samal ajal sellistele proovidele omast suurt hõljuvaine sisaldust. Kõnealuse hõljuvaine roll pärssiva mõju avaldumisel ei ole teada, kuid on võimalik, et uuritava kemikaali reageerimine muda koostisosadega ja adsorbeerumine tahketele osakestele vähendab uuritava kemikaali mürgisust.

A.4. Üks oluline tegur on ka temperatuur: tingimuste range jäljendamise huvides tuleks katse teha proovivõtukoha temperatuuril, kuna on teada, et eri rühmadesse kuuluvad metaani tootvad bakterid eelistavad eri temperatuurivahemikke – termofiilid temperatuuri umbes 30–35 °C, mesofiilid temperatuuri 20–25 °C ja psührofiilid temperatuuri alla 20 °C – ning neile avalduv pärssiv mõju võib olla erinev.

A.5. Kestus. Võrdlusuuringus täheldati, et 1. osa kohases üldkatses lahjendamata reoveemudaga toodetakse 2–4 ööpäeva jooksul alati piisavas koguses gaasi, kuid 2. osa kohases katses sajakordselt lahjendatud reoveemudaga toodetakse sama perioodi jooksul liiga vähe gaasi või ei toodeta seda üldse. Madsen *et al*. (1996) on viimati nimetatud katset kirjeldades seisukohal, et katse kestus peaks olema vähemalt 7 ööpäeva.

Katse väikesel biomassi kontsentratsioonil (valik b)

Põhitekstis tuleks teha järgmised muudatused ja parandused, millega täiendatakse mõnda olemasolevat punkti või alapunkti või asendatakse need.

▼**M6**

A.6. Punkti 6 „Katse põhimõte” täiendatakse järgmiselt:

„Seda meetodit võib kasutada sajakordselt lahjendatud anaeroobse reoveemuda puhul, millega osaliselt jäljendatakse loodusliku muda ja sette väikest aktiivsust. Inkubeerimistemperatuur võib olla kas 35 °C või proovi kogumiskohas valitsev temperatuur. Kuna bakterite aktiivsus sellises proovis on oluliselt väiksem kui lahjendamata reoveemudas, tuleks inkubeerimisperioodi pikendada vähemalt 7 ööpäevani.”

A.7. Punkti 12 alapunkti a täiendatakse järgmiselt:

„inkubaator peaks olema võimeline hoidma ka madalamat, 15 °C-ni ulatuvat temperatuuri;”

A.8. Punkti 13 lõppu lisatakse järgmine reaktiiv:

„Fosforhape (H_3PO_4) – 85 massiprotsendiline vesilahus.”

A.9. Punkti 16 lõppu lisatakse järgmine lause:

„Katses kasutava tahke kuivaine lõplik üldsisaldus on 0,20 ± 0,05 g/l.”

A.10. Punkt 17: katsesubstraat.

Seda substraati ei kasutata, vaid see asendatakse pärmiekstraktiga (vt punktid 17, A.11, A.12 ja A.13).

A.11. Anaeroobse reoveemuda lahjendamiseks on vaja mikroelemente sisaldavat mineraalset toitelahust, millele mugavuse huvides lisatakse orgaanilise substraadina pärmiekstrakt.

Punkti 17 lõppu lisatakse järgmine tekst:

„a) Katses kasutatav mineraalne toitelahus pärmiekstraktiga.

See toitelahus valmistatakse 10 korda kontsentreeritumast toitelahusest (punkti 17 alapunkt b ja punkt A.12) ja mikroelementide lahusest (punkti 17 alapunkt c ja punkt A.13). Kasutatakse äsja tarnitud naatriumsulfiidnonahüdraati (punkti 17 alapunkt b ja punkt A.12) või pestakse ja kuivatatakse see enne kasutamist, et tagada selle piisav redutseerimisvõime. Kui katse tegemisel ei kasutata kindakambrit (punkti 12 alapunkt j), tuleks suurendada naatriumsulfiidi sisaldust põhilahuses nii, et see oleks 1 g/l asemel 2 g/l. Naatriumsulfiidi võib oksüdeerumisohu vähendamiseks lisada sobiva põhilahuse kujul ka suletud katsepudeli korgi kaudu, et saavutada lõppsisaldus 0,2 g/l. Teise võimalusena võib kasutada titaan(III)tsitraati (punkti 17 alapunkt b). See lisatakse suletud katsepudeli korgi kaudu, et saavutada kontsentratsioon 0,8–1,0 mmol/l. Titaan(III)tsitraat on vähemürgine ja väga tõhus redutseeriv aine, mis valmistatakse järgmiselt: 2,94 g trinaatriumtsitraatdihüdraati lahustatakse 50 ml hapnikuvabas lahjendusvees (punkt 14), et saada lahus kontsentratsiooniga 200 mmol/l, ning lisatakse 5 ml titaan(III)kloriidi lahust (15 g ainet 100 ml lahjendusvee kohta). Lahuse pH reguleeritakse naatriumkarbonaadiga tasemele 7 ± 0,5 ühikut ja see viiakse gaasilise lämmastiku joa all sobivasse seerumipudelisse. Titaan(III)tsitraadi kontsentratsioon selles põhilahuses on 164 mmol/l. Toitelahust kasutatakse kohe või säilitatakse 4 °C juures kuni 1 ööpäev.

A.12. b) Kümme korda kontsentreeritum toitelahus – valmistatakse järgmistest koostisainetest:

veevaba kaaliumdivesinikfosfaat (KH_2PO_4)	2,7 g;
dinaatriumvesinikfosfaat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(või 11,2 g dodekahüdraati);	5,3 g;
ammooniumkloriid (NH_4Cl)	

▼**M6**

kaltsiumkloriiddihüdraat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g;
magneesiumkloriidheksahüdraat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g;
raud(II)kloriidtetrahüdraat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g;
resasuriin (redoksindikaator)	0,01 g;
naatriumsulfiidnonahüdraat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
või titaan(III)tsitraat lõppkontsentratsiooniga	0,8–1,0 mmol/l;
mikroelementide lahus (vt punkti 17 alapunkt c ja punkt A.13)	10,0 ml;
pärmiekstrakt	100 g.
Ained lahustatakse lahjendusvees (punkt 14) ja lahuse ruumala viiakse	1 000 milliliitrini.

A.13. c) Mikroelementide lahus – valmistatakse järgmistest koostisainetest:

mangaan(II)kloriidtetrahüdraat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g;
ortoboorhape (H_3BO_3)	0,05 g;
tsinkkloriid ($ZnCl_2$)	0,05 g;
vask(II)kloriid ($CuCl_2$)	0,03 g;
naatriummolübdaatdihüdraat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g;
koobalt(II)kloriidheksahüdraat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g;
nikkel(II)kloriidheksahüdraat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g;
dinaatriumselenit (Na_2SeO_3)	0,05 g.
Ained lahustatakse lahjendusvees (punkt 14) ja lahuse ruumala viiakse	1 000 milliliitrini.”

A.14. Punkt 25: eelkatse.

On oluline teha eelkatse punktis 24 kirjeldatud viisil; ainsa erinevusena peaks muda tahke aine sisaldus olema kirjeldatust sada korda väiksem ehk 0,1 g/l, 0,2 g/l ja 0,4 g/l. Inkubeerimise kestus peaks olema vähemalt 7 ööpäeva.

Märkus: võrdlusuuringus (5) oli vabaruumi maht liiga suur – 75 % üldruumalast; see peaks jääma soovitatavasse vahemikku 10–40 %. Siin tuleks asjakohase kriteeriumina tagada, et umbes 80-protsendilise pärssumise puhul toodetav gaasikogus oleks mõõdetav vastuvõetava täpsusega (nt ± 5 % kuni ± 10 %).

A.15. Punktid 26–30: uuritava kemikaali, inokulumi ja substraadi lisamine.

Kõnealused koostisosad lisatakse nimetatud punktides kirjeldatud viisil, kuid substraadilahus (punkt 17) asendatakse toitelahusega, mis sisaldab substraadina pärmiekstrakti (A.11).

Samuti vähendatakse muda kuivaine lõppsisaldust nii, et see on 2–4 g/l asemel 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Koostisosade lisamise kohta on esitatud kaks näidet tabelis A.1, millega asendatakse tabel punktis 29.

A.16. Punkt 33: pudelite inkubeerimine.

Kuna gaasitootmise kiirus on eeldatavalt väiksem, kestab inkubeerimine vähemalt 7 ööpäeva.

▼**M6**

A.17. Punkt 34: rõhu mõõtmine.

Kui on vaja registreerida gaasikogus gaasifaasis, kasutatakse pudelite vabaruumis rõhu mõõtmiseks punktis 34 kirjeldatud meetodit. Kui soovitakse mõõta CO_2 ja CH_4 summaarset üldkogust, vähendatakse vedela faasi pH väärtust tasemeni 2 ühikut, süstides igasse asjaomasesse pudelisse H_3PO_4, ja mõõdetakse rõhku pärast 30 minuti pikkust loksutamist katsetemperatuuril. Inokulumi kvaliteedi kohta täpsema teabe saamiseks tuleks mõõta rõhku igas pudelis siiski nii enne kui ka pärast hapestamist. Näiteks kui CO_2 tootmise kiirus on metaanitootmise kiirusest palju suurem, võib kääritavate bakterite tundlikkus muutuda ja/või uuritava kemikaali mõju metaani tootvatele bakteritele on suurem.

A.18. Punkt 36: pH mõõtmine.

H_3PO_4 kasutamise korral tuleb kasutada eelkõige pH mõõtmiseks täiendavalt paari lisapudelit, kuhu ei lisata H_3PO_4.

VIIDE:

Madsen, T., Rasmussen, H. B., ja Nilsson, L. (1996). Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No. 336. Veekvaliteedi Instituut, Taani Keskkonnakaitseamet, Kopenhaagen.

Tabel A.1.

Katsepartiide valmistamise näited.

Reaktsioonisegu koostisosad	Näide 1	Näide 2	Tavapärane lisamise järjekord
Valmistatud inokulumi kontsentratsioon (g/l)	0,42	2,1	—
Lisatav inokulumi kogus (ml)	45	9	4
Inokulumi sisaldus katsepudelis (g/l)	0,20	0,20	—
Lisatav toitelahuse kogus (ml)	9	9	2
Lisatav lahjendusvee kogus (ml)	36	72	3
Pärmiekstrakti sisaldus katsepudelis (g/l)	9,7	9,7	—
Uuritava kemikaali põhilahuse kogus (ml)	3	3	1
Vedeliku üldmaht (ml)	93	93	—

▼**M6**

5. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Kemikaal – aine või segu.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M6

C.35. *LUMBRICULUS*'ELE AVALDUVA MÜRGISUSE HINDAMISE KATSE RIKASTATUD SETTEGA SÜSTEEMIS SETE/VESI

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 225 (2007). Põhjasettes elavate setet neelavate loomade kokkupuude settes leiduvate kemikaalidega võib olla ulatuslik ja seepärast tuleks neile erilist tähelepanu pöörata (nt allikad 1, 2, 3). Selliste setet neelavate loomade hulka kuuluvad veekeskkonna väheharjasussid, kes täidavad olulist rolli veeökosüsteemides esinevas settes. Need loomad võivad sette bioturbatsiooni kaudu ja saakloomaks olles mõjutada olulisel määral asjaomaste kemikaalide biosaadavust muudele organismidele, näiteks põhjatoidulistele kaladele. Erinevalt põhjasette pinnal elavatest organismidest kaevuvad põhjasettes elavad veekeskkonna väheharjasussid (nt *Lumbriculus variegatus*) sette sisse ja neelavad sette pinnast sügavamal paiknevaid setteosakesi. Sellest tulenevalt puutuvad kõnealused katseorganismid uuritava kemikaaliga kokku igal võimalikul viisil (nt nahakaudsel kontaktil ja saastunud setteosakeste allaneelamisel, kuid samuti poorides oleva vee ja sette kohal oleva vee kaudu).

2. Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et hinnata põhjasettes elavale väheharjasussile *Lumbriculus variegatus* (Müller) avalduvat mõju pikaajalisel kokkupuutel settes esinevate kemikaalidega. Meetod põhineb olemasolevatel sette mürgisuse ja bioakumuleerumise hindamise meetoditel (nt allikad 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Selles käsitletakse staatilisi katsetingimusi. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse kokkupuute saavutamiseks sette rikastamist uuritava kemikaaliga. Rikastatud sette kasutamisega jäljendatakse sette saastumist uuritava kemikaaliga.

3. Kemikaalid, mille mõju settes elavatele organismidele on vaja hinnata, säilivad selles keskkonnas tavaliselt pikka aega. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga kokku puutuda mitmel viisil. Iga kokkupuuteviisi suhteline tähtsus ja üldisse mürgisesse mõjusse panuse andmiseks kuluv aeg sõltub asjaomase kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest ja säilivusest looma organismis. Tugevasti adsorbeeruvate kemikaalide (näiteks kemikaalid, mille log K_{ow} > 5) või settega kovalentseid sidemeid moodustavate kemikaalide puhul võib üks oluline kokkupuuteviis olla saastunud toidu allaneelamine. Et selliste kemikaalide mürgisust mitte alahinnata, lisatakse katseorganismide paljunemiseks ja kasvamiseks vajalik sööt settele enne uuritava kemikaaliga töötlemist (11). Kirjeldatav katsemeetod on katse tegemiseks piisavalt üksikasjalik, kuid võimaldab samal ajal kohandada katseplaani vastavalt tingimustele igas konkreetses laboris ja lähtuvalt uuritavate kemikaalide omadustest.

4. Katsemeetodiga hinnatakse uuritava kemikaali mõju katseorganismide paljunemisele ja biomassile. Katses mõõdetavad bioloogilised näitajad on ellujäänud usside üldarv ja biomass (kuivmass) kokkupuuteperioodi lõpus. Nende andmete analüüsimiseks kasutatakse kas regressioonimudelit, et leida hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x % (nt EC_{50}, EC_{25} või EC_{10}), või statistilise hüpoteesi kontrollimist, et määrata täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon ja vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon.

5. Paljud olulised ja kasulikud üksikasjad sette mürgisuse hindamist käsitleva käesoleva katsemeetodi väljatöötamiseks pärinevad käesoleva lisa peatükist C.27 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud sette kasutamisega” (6). See peatükk võeti seega aluseks ning seda muudeti vajalikul viisil, et kohandada seda sette mürgisuse hindamise katsete tegemiseks *Lumbriculus variegatus*'ega. Peale selle osutatakse muudele dokumentidele, mille hulgas on näiteks USA Materjalide Katsetamise Ühingu dokument „Standard guide

▼M6

for determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates" (3), USA Keskkonnakaitseameti dokument „Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates" (7) ja USA Materjalide Katsetamise Ühingu dokument „Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates" (12). Lisaks on käesoleva meetodi väljatöötamisel kasutatud olulise teabeallikana katsemeetodi valideerimiseks tehtud võrdlusuuringust (allikas 13: võrdlusuuringu aruanne) saadud praktilisi kogemusi ja kirjanduse andmeid.

NÕUTAV TEAVE JA ABITEAVE

6. Enne katse alustamist peaksid uuritava kemikaali kohta olema teada näiteks asjakohased ohutusabinõud, sobivad säilitustingimused ja analüüsimeetodid. Juhised selliste kemikaalide mõju hindamiseks, mille füüsikalis-keemilised omadused muudavad katse tegemise raskeks, on esitatud allikas 14.

7. Enne katse alustamist peaksid uuritava kemikaali kohta olema teada järgmised andmed:

— tavanimetus, keemiline nimetus (soovitatavalt IUPACi nimetus), struktuurivalem, CASi registrinumber, puhtus;

— aururõhk;

— lahustuvus vees.

8. Lisaks on enne katse alustamist kasulik teada järgmisi andmeid:

— jaotuskoefitsient süsteemis oktanool/vesi (K_{ow});

— jaotuskoefitsient süsteemis orgaaniline süsinik/vesi (K_{oc});

— hüdrolüüsi andmed;

— andmed fotokeemilise muundumise kohta vees;

— biolagunduvuse andmed;

— pindpinevus.

9. Enne katse alustamist peaksid olema teada ka kasutatava sette teatavad omadused (7). Üksikasjad on esitatud punktides 22–25.

KATSE PÕHIMÕTE

10. Sarnases füsioloogilises seisundis ussid (sünkroonitud vastavalt 5. liites kirjeldatule) viiakse kokkupuutesse mürgise kemikaaliga, millega on eri kontsentratsioonides töödeldud settefaasi süsteemis sete/vesi. Katsekeskkonnana tuleks kasutada kunstlikku setet ja taastatud vett. Kontrollina kasutatakse katsenõusid, millesse ei lisata uuritavat kemikaali. Uuritav kemikaal lisatakse iga kontsentratsiooni puhul settesse enne sette nõudesse jaotamist, et varieeruvus igale kontsentratsioonile vastavate paralleelnõude vahel oleks minimaalne, ning seejärel lisatakse katseorganismid katsenõudesse, milles kemikaal on saavutanud settes ja vees tasakaalukontsentratsiooni (vt punkt 29). Katseloomadel lastakse süsteemiga sete/vesi kokku puutuda 28 päeva vältel. Tulenevalt kunstliku sette väikesest toitainesisaldusest tuleks settele lisada sööta (vt punktid 22–23 ja 4. liide), et tagada usside kasvamine ja paljunemine kontrolltingimustes. Sel viisil tagatakse, et katseloomad puutuvad kemikaaliga kokku nii vee ja sette kui ka toidu kaudu.

11. Seda tüüpi katse puhul on soovitatav lõppnäitaja nii sigivuse kui ka biomassi puhul EC_x (nt EC_{50}, EC_{25} või EC_{10}; kontsentratsioon, mille puhul mõju avaldub x protsendile organismidest), mis leitakse võrdluses kontrollrühma andmetega. Tuleks siiski märkida, et arvestades väiksemat

▼M6

mõju väljendava EC_x (nt EC_{10}, EC_{25}) väikest täpsusastet, mille puhul usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on äärmiselt lai (nt allikas 15) ja hüpoteesi kontrollimise käigus arvutatud statistiline võimsus on väike, loetakse kõige usaldusväärsemaks lõppnäitajaks EC_{50}. Peale selle võib juhul, kui katseplaan ja andmed seda võimaldavad, nii sigivuse kui ka biomassi puhul arvutada täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni ja vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (vt punktid 34–38). Katseplaani koostamisel lähtutakse katse eesmärgist: kas soovitakse määrata EC_x või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon.

VÕRDLUSKATSED

12. Kontrollrühma organismidega saadud tulemused on eeldatavalt piisav tõendus labori võimekusest kõnealust katset läbi viia ja varasemate andmete olemasolu korral ka tõendus katse korratavuse kohta. Peale selle võib teha korrapäraselt mürgisuse võrdluskatseid, kasutades katseorganismide tundlikkuse hindamiseks mürgist võrdluskemikaali. Katseloomade tundlikkuse ja seisundi rahuldavaks hindamiseks sobib 96 h pikkune mürgisuse võrdluskatse, mis tehakse üksnes vees (4, 7). Teave pentaklorofenooli mürgisuse kohta täismahus katses (28 päeva pikkune kokkupuude rikastatud settega) on esitatud 6. liites ja käesolevat katsemeetodit käsitleva võrdlusuuringu aruandes (13). Pentaklorofenooli ägedat mürgisust üksnes vees kirjeldatakse näiteks allikas 16. Seda teavet saab kasutada katseorganismide tundlikkuse võrdlemiseks võrdluskatsetes, kus mürgise võrdluskemikaalina kasutatakse pentaklorofenooli. *L. variegatus*'e puhul on soovitatud kasutada mürgise võrdluskemikaalina kaaliumkloriidi (KCl) või vasksulfaati ($CuSO_4$) (4, 7). KCl mürgisust käsitlevate andmete põhjal kvaliteedikriteeriumide kehtestamine on raske, kuna praegu puuduvad kirjanduse andmed *L. variegatus*'e kohta. Teave vase mürgisuse kohta *L. variegatus*'ele on esitatud allikates 17–21.

KATSE NÕUETEKOHASUS

13. Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised kriteeriumid.

— Võrdlusuuringust (13) nähtub, et *Lumbriculus variegatus*'e puhul peaks elus usside keskmine arv kontrollrühma paralleelnõu kohta suurenema kokkupuuteperioodi algusega võrreldes kokkupuuteperioodi lõpuks vähemalt 1,8 korda.

— Sette kohal oleva vee pH jääb kogu katse vältel vahemikku 6–9.

— Hapnikusisaldus sette kohal olevas vees ei tohiks katse vältel olla väiksem kui 30 % õhu küllastuskontsentratsioonist katsetemperatuuril.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Katsesüsteem

14. Soovitatakse kasutada staatilist süsteemi, mille puhul sette kohal olevat vett ei uuendata. Sette ja vee sobiva vahekorra puhul (vt punkt 15) piisab tavaliselt kergest aereerimisest, et säilitada katseorganismidele vastuvõetav vee kvaliteet (nt tagada võimalikult suur lahustunud hapniku sisaldus ja võimalikult vähene väljaheidete kuhjumine). Poolstaatilist või läbivooluga süsteemi, mille puhul sette kohal olevat vett perioodiliselt või pidevalt uuendatakse, tuleks kasutada üksnes erandjuhul, kuna vee korrapärane uuendamine mõjutab eeldatavalt kemikaali tasakaalukontsentratsiooni (nt põhjustab kemikaali kadu katsesüsteemist).

Katsenõud ja seadmed

15. Katse läbiviimiseks tuleks kasutada keeduklaase, näiteks mahuga 250 ml ja diameetriga 6 cm. Võib kasutada muid sobivaid klaasnõusid, kui nende puhul tagatakse sette ja selle kohal oleva vee piisav sügavus. Igasse nõusse

▼M6

tuleks kanda umbes 1,5–3 cm paksune kiht valmistatud setet. Settekihi paksuse ja selle kohal oleva veekihi paksuse suhe peaks olema 1:4. Nõude maht peaks vastama asustamistihedusele, st sette massiühiku kohta lisatavale katseusside arvule (vt ka punkt 39).

16. Katsenõud ja muud seadmed, mis puutuvad kokku uuritava kemikaaliga, peaksid olema üleni klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Tuleks hoolikalt jälgida, et seadmete üheski osas ei kasutataks materjale, mis võivad lahustuda, uuritavat kemikaali absorbeerida või muid kemikaale eraldada ning katseloomadele kahjulikku mõju avaldada. Katse kasvukeskkonnaga kokku puutuvates seadmetes tuleks kasutada polütetrafluoroetüleeni, roostevaba terast ja/või klaasi. Orgaaniliste kemikaalide puhul, mis teadaolevalt adsorbeeruvad klaasile, võib olla vaja kasutada silaanitud klaasi. Sellisel juhul tuleb seadmed pärast kasutamist ära visata.

Katseliik

17. Siin kirjeldatud tüüpi katses kasutatav katseliik on magevee väheharjasuss *Lumbriculus variegatus* (Müller). See liik on tolerantne paljude eri tüüpi setete suhtes ning seda kasutatakse laialdaselt sette mürgisuse ja bioakumuleerumise hindamise katsetes (nt allikad 3, 5, 7, 9, 13, 15, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35). Tuleks esitada teave katseloomade päritolu, liigi kinnitava määramise (nt allikas 36) ja kultiveerimistingimuste kohta. Liigi määramine iga katse eel ei ole vajalik, kui katseorganismid pärinevad kohapealsest kultuurist.

Katseorganismide kultiveerimine

18. Sette mürgisuse hindamise katse jaoks piisava arvu usside saamiseks on kasulik säilitada usse alalises laborikultuuris. *Lumbriculus variegatus*'e laborikultuuris kasvatamise meetodeid käsitlevad juhised ja lähtekultuuride allikad on esitatud 5. liites. Üksikasjalik teave selle liigi kultiveerimise kohta on esitatud allikates 3, 7 ja 27.

19. On tungivalt soovitatav luua ühte liiki sisaldav kultuur, mis võimaldab tagada, et katsed viiakse läbi sama liigi loomadega. Veendutakse, et kultuuris ja eelkõige katsete jaoks kasutatavatel ussidel ei esine nähtavaid haigustunnuseid ega hälbeid.

Vesi

20. Katses soovitatakse sette kohal oleva veena kasutada käesoleva lisa peatükis C.1 kirjeldatud taastatud vett; seda võib kasutada ka usside laborikultuuri puhul (selle valmistamist kirjeldatakse 2. liites). Vajaduse korral võib kasutada looduslikku vett. Kasutamiseks valitud vesi peab olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab katseloomadel nii kohanemis- kui ka katseperioodi vältel selles kasvada ja paljuneda, ilma et nende välimus või käitumine muutuks ebanormaalseks. On tõendatud, et *Lumbriculus variegatus* suudab kõnealuses taastatud vees elada, kasvada ja paljuneda (30), ning selline vesi võimaldab katse- ja kultiveerimistingimusi maksimaalselt standardiseerida. Taastatud vee kasutamise korral tuleks esitada selle koostis ning enne kasutamist tuleks määrata vähemalt selle pH, hapnikusisaldus ja karedus (väljendatuna $CaCO_3$ sisaldusena milligrammides liitri kohta). Kasulikku teavet võib anda ka vee kasutuseelne analüüsimine mikrosaasteainete suhtes (vt nt 3. liide).

21. Sette kohal oleva vee pH peaks jääma vahemikku 6,0–9,0 (vt punkt 13). Kui võib eeldada, et tekib suurem kogus ammoniaaki, peetakse otstarbekaks hoida pH väärtus vahemikus 6,0–8,0. Kui katses hinnatakse näiteks nõrka orgaanilist hapet, on soovitatav kasutada pH reguleerimiseks katses kasutatava vee puhverdamist, näiteks allikas 16 kirjeldatud viisil. Katses kasutatava vee üldkaredus peaks jääma loodusliku vee puhul vahemikku 90–300 mg $CaCO_3$ liitri kohta. OECD juhendi nr 210 (38) kohased lahjendusvee vastuvõetavuse lisakriteeriumid on kokkuvõtlikult esitatud 3. liites.

▼M6

Sete

22. Kuna ühest konkreetsest allikast pärit saastumata looduslik sete ei pruugi olla kogu aasta vältel kättesaadav ning selles looduslikult esinevad organismid ja võimalikud mikrosaasteained võivad mõjutada katsetulemusi, tuleks soovitatavalt kasutada valmistatud setet (tuntud ka kui taastatud, kunstlik või sünteetiline sete). Valmistatud sette kasutamisega minimeeritakse katsetingimuste varieeruvus ja looduslikus settes eluneva fauna esinemise võimalus. Allpool kirjeldatud valmistatud sette puhul on lähtutud allikate 6, 39 ja 40 kohasest kunstlikust settest. Seda soovitatakse kasutada siin kirjeldatud tüüpi katse puhul (6, 10, 30, 41, 42, 43).

a) 4–5 % (kuivmass) turbasamblaturvast; on oluline kasutada keskmise lagunemisastmega, üksnes õhu käes kuivatatud peeneks jahvatatud pulbrilist turvast osakeste suurusega ≤ 0,5 mm.

b) 20 ± 1 % (kuivmass) kaoliinsavi (soovitatav kaoliniidisisaldus üle 30 %).

c) 75–76 % (kuivmass) kvartsliiva (peen liiv tera suurusega ≤ 2 mm, kusjuures > 50 % osakestest peaks olema vahemikus 50–200 μm.

d) Sette kuivadele koostisosadele lisatav deioniseeritud vesi, 30–50 % sette kuivmassist.

e) Lõpliku settesegu pH reguleerimiseks lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$).

f) Lõpliku segu orgaanilise süsiniku üldsisaldus peaks olema 2 ± 0,5 % sette kuivmassist ja selle reguleerimiseks tuleks kasutada sobivas koguses alapunktide a ja c kohast turvast ja liiva.

g) Sette kuivadele koostisosadele lisatav sööt, näiteks farmaatsiastandarditele vastavad inimtarbimiseks ette nähtud kõrvenõgese (*Urtica* sp.) pulbristatud lehed või selliste lehtede ja α-tselluloosi segu (vahekorras 1:1), 0,4–0,5 % sette kuivmassist; üksikasjalik teave on esitatud 4. liites.

23. Turba, kaoliinsavi, söödamaterjali ja liiva päritolu peaks olema teada. Peale alapunktis g nimetatu on käesoleva lisa peatükis C.27 (6) loetletud võimaliku muu kasutatava toiteallikana järgmine taimne materjal: mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) või orase kuivatatud lehed.

24. Valitud sööt tuleks lisada settele enne uuritava kemikaali lisamist või sellega samaaegselt. Valitud sööt peaks tagama vähemalt vastuvõetava sigivuse kontrollrühmas. Kasulikku teavet võib anda kunstliku sette või selle koostisosade analüüsimine mikrosaasteainete suhtes. Kunstliku sette valmistamise näide on esitatud 4. liites. Kuivade koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast vee lisamist settele ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste kerkimine veepinnale) ja et turvas või sete on ümbritseva keskkonna tingimustes piisavalt tasakaalustunud (vt ka punkt 25 ja 4. liide). Kunstliku sette iseloomustamiseks tuleks esitada vähemalt selle koostisosade päritolu, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsentuaalne sisaldus), orgaanilise süsiniku üldsisaldus, veesisaldus ja pH. Redokspotentsiaali mõõtmine ei ole kohustuslik.

25. Vajaduse korral, näiteks kui katse spetsiifika seda nõuab, võib katse- ja/või kultiveerimissettena kasutada ka saastevabast allikast pärit looduslikku setet (3). Loodusliku sette kasutamisel tuleks esitada vähemalt selle päritolu (kogumiskoht), poorides oleva vee pH ja ammoniaagisisaldus, orgaanilise

▼M6

süsiniku ja lämmastiku üldsisaldus, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsentuaalne sisaldus) ja vee protsentuaalne sisaldus (7) ning selline sete ei tohiks olla saastunud ega sisaldada katseorganismidega konkureerida või neist toituda võivaid muid organisme. Redokspotentsiaali ja katioonivahetusmahtuvuse mõõtmine ei ole kohustuslik. Looduslikul settel on enne sellele kemikaali lisamist soovitatav lasta seitsme päeva vältel tasakaalustuda samades tingimustes, mida kasutatakse järgneva katse ajal. Selle kohandamisperioodi lõpus tuleks sette kohal olev vesi eemaldada ja ära visata.

26. Kasutatav sete peab olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab kontrollrühma organismidel kokkupuuteperioodi vältel selles ellu jääda ja paljuneda, ilma et nende välimus või käitumine muutuks ebanormaalseks. Kontrollrühma ussid peaksid settesse kaevuma ja seda alla neelama. Paljunemine kontrollrühmas peaks vastama vähemalt punktis 13 kirjeldatud nõuetekohasuse kriteeriumidele. Tuleks registreerida väljaheitegraanulite esinemine või puudumine sette pinnal – see annab märku sellest, kas ussid neelavad setet, ning võib kokkupuuteviisile osutamise kaudu hõlbustada katsetulemuste tõlgendamist. Sette neelamist käsitleva lisateabe saamiseks võib kasutada allikates 24, 25, 44 ja 45 kirjeldatud meetodeid, milles määratletakse täpsemalt katseorganismide puhul täheldatav sette neelamine või osakeste valimine.

27. Meetodeid loodusliku sette käitlemiseks enne selle laboris kasutamist kirjeldatakse allikates 3, 7 ja 12. *Lumbriculus*'ega tehtava katse jaoks soovitatava kunstliku sette valmistamist ja säilitamist kirjeldatakse 4. liites.

Uuritava kemikaaliga töötlemine

28. Uuritav kemikaal lisatakse settesse. Kuna enamik uuritavaid kemikaale on eeldatavalt vees raskesti lahustuvad, tuleks need põhilahuse valmistamiseks lahustada võimalikult väikeses koguses sobivas orgaanilises lahustis (nt atsetoon, *n*-heksaan, tsükloheksaan). Katselahuste valmistamiseks tuleks põhilahust lahjendada sama lahustiga. Sobiva lahusti valimisel peaksid peamised kriteeriumid olema lahusti mürgisus ja lenduvus ning uuritava kemikaali lahustuvus valitud lahustis. Iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada sama kogust asjaomast lahust. Uuritav kemikaal lisatakse iga kontsentratsiooni puhul settesse enne sette nõudesse jaotamist, et kemikaalisisalduse varieeruvus paralleelnõude vahel oleks minimaalne. Iga katselahus segatakse kvartsliivaga, nagu on kirjeldatud punktis 22 (nt 10 g kvartsliiva katsenõu kohta). On leitud, et kvartsliiva täielikuks küllastamiseks piisab 0,20–0,25 ml lahusest grammi liiva kohta. Seejärel tuleb lahustil lasta aurustuda, kuni liiv on kuiv. Uuritava kemikaali samaaegsest aurustumisest tuleneva (nt kemikaali aururõhust sõltuva) kao minimeerimiseks tuleks kemikaaliga kaetud liiva kasutada vahetult pärast kuivatamist. Iga asjaomase kontsentratsiooni puhul segatakse kuiv liiv sobiva koguse valmistatud settega. Sette valmistamisel tuleks arvesse võtta uuritava aine ja liiva seguna lisatavat liivakogust (st sette valmistamisel kasutatav liivakogus peaks olema selle võrra väiksem). Selle meetodi peamine eelis on see, et settesse ei viida praktiliselt üldse lahustit (7). Teise võimalusena võib näiteks loodusliku sette puhul kasutada uuritava kemikaali lisamiseks eespool kirjeldatud viisil kvartsliiva asemel teatud osa settest, mis on kuivatatud ja peeneks jahvatatud, või segada uuritava kemikaali märja settega ja lasta kasutatud lahustil seejärel aurustuda. Tuleks jälgida, et settele lisatav uuritav kemikaal seguneks settega põhjalikult ja jaotuks selles ühtlaselt. Vajaduse korral võib kemikaali soovitud sisaldust settes ja selle jaotumise homogeensust kontrollida osaproovide analüüsimise teel. Kemikaali soovitud sisaldust settes võib olla kasulik kontrollida ka katselahuste osaproovide analüüsimise teel. Kuna

▼M6

kvartsliiva katmiseks uuritava kemikaaliga kasutatakse lahustit, tuleks valmistada ka lahustiga kontrollproovid, millesse lisatakse samas koguses lahustit kui uuritava kemikaaliga proovidesse. Katseprotokolli tuleks märkida rikastamiseks kasutatud meetod ja eespool kirjeldatutest erineva muu meetodi kasutamise korral selle valimise põhjendus. Rikastamismeetodit võib kohandada vastavalt uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistele omadustele, näiteks selleks, et hoida ära lendumisest tulenevat kadu kemikaali lisamise või tasakaalustamise ajal. Rikastamismeetodeid käsitlevad lisajuhised on esitatud Environment Canada 1995. aasta dokumendis (46).

29. Pärast rikastatud sette valmistamist, katsenõudesse jaotamist ja katses kasutatava veega katmist on soovitatav lasta uuritaval kemikaalil jaotuda settefaasi ja veefaasi vahel (nt allikad 3, 7, 9). Seda tuleks soovitatavalt teha katsetemperatuuril ja katses kasutatavates aereerimistingimustes. Vajalik tasakaalustamisaeg sõltub settest ja kemikaalist ning võib ulatuda tundidest päevade ja harvadel juhtudel isegi mitme (4–5) nädalani (nt allikad 27, 47). Käesoleva katsemeetodi puhul ei oodata tasakaalu saabumiseni, vaid kasutatakse soovitatavalt tasakaalustusperioodi kestusega 48 tundi kuni 7 ööpäeva. Sellega minimeeritakse uuritava kemikaali lagunemine. Olenevalt katse eesmärgist, näiteks kui soovitakse jäljendada keskkonnatingimusi, võib rikastatud sette tasakaalustus- või vanandamisperiood olla pikem.

30. Tasakaalustusperioodi lõpus tuleks uuritava kemikaali sisalduse analüüsimiseks võtta miinimumnõudena proovid sette koondproovist ja selle kohal olevast veest vähemalt suurimal kasutataval kontsentratsioonil ja ühel väiksemal kontsentratsioonil. Kõnealune uuritava kemikaali analüütiline määramine peaks võimaldama arvutada massibilanssi ja väljendada tulemusi lähtuvalt mõõdetud algkontsentratsioonist. Üldjuhul häirib proovivõtmine süsteemi sete/vesi tasakaalu või hävitab selle. Seepärast ei ole tavaliselt võimalik kasutada sama paralleelproovi nii setteproovi võtmiseks kui ka usside jaoks. Analüüsimiseks tuleb võtta kasutusele sobiva suurusega lisanõud, mida käideldakse samal viisil ja mis sisaldavad muu hulgas katseorganisme, kuid mida ei kasutata bioloogiliste vaatluste tegemiseks. Selliste nõude suurus valitakse nii, et see võimaldaks võtta asjaomase analüüsimeetodi puhul vajaliku koguse proovi. Proovivõtmist kirjeldatakse üksikasjalikult punktis 53.

KATSE KÄIK

Eelkatse

31. Kui uuritava kemikaali mürgisuse kohta *Lumbriculus variegatus*'ele puuduvad andmed, võib olla kasulik teha eelkatse, et teha kindlaks lõpliku katse jaoks sobiv kontsentratsioonivahemik ja lõplikus katses kasutatavad optimaalsed tingimused. Selleks kasutatakse uuritava kemikaali laia kontsentratsioonide vahemikku. Ussidel lastakse teatava perioodi vältel (nt 28 päeva jooksul, nagu lõplikus katseski) puutuda kokku uuritava kemikaaliga igal kasutataval kontsentratsioonil, et teha kindlaks lõpliku katse jaoks sobivad kontsentratsioonid; paralleelproove ei ole vaja kasutada. Eelkatse käigus tuleks jälgida usside käitumist ja see registreerida, näiteks kui täheldatakse sette vältimist uuritava kemikaali ja/või sette enda tõttu. Eelkatses ei tohiks kasutada kontsentratsiooni, mis on suurem kui 1 000 mg sette kuivmassi kilogrammi kohta.

Lõplik katse

32. Lõplikus katses tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni, mis on valitud näiteks kontsentratsioonivahemiku leidmiseks tehtud eelkatse (punkt 31) tulemuste põhjal ja mis vastavad punktides 35, 36, 37 ja 38 kirjeldatule.

▼M6

33. Lisaks uuritava kemikaaliga proovidele kasutatakse katses kontrollproove (nõutav paralleelproovide arv on esitatud punktides 36, 37 ja 38), mis sisaldavad kõiki koostisosi peale uuritava kemikaali. Kui uuritava kemikaaliga töötlemiseks kasutatakse lahustit, ei tohiks see avaldada katseorganismidele märkimisväärset mõju; selle hindamiseks kasutatakse üksnes lahustiga töödeldud täiendavat kontrolli.

Katseplaan

34. Katseplaanis nähakse ette katses kasutatavate kontsentratsioonide arv ja intervall, igal kontsentratsioonil kasutatavate nõude arv ning igasse nõusse lisatavate usside arv. Katseplaane EC_x ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni hinnangulise väärtuse leidmiseks ning piirsisalduskatse tegemiseks kirjeldatakse punktides 35, 36, 37 ja 38.

35. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x (nt EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) väärtust ja kontsentratsioonivahemikku, mille puhul uuritav kemikaal avaldab huvipakkuvat mõju. Tuleks hoiduda ekstrapoleerimisest väärtuseni, mis on oluliselt väiksem kui väikseim kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse mõju katseorganismidele, või suurem kui suurim katses kasutatav kontsentratsioon. Kui sellist ekstrapoleerimist erandjuhul siiski kasutatakse, tuleb katseprotokollis esitada selle kohta ammendav selgitus.

36. Kui soovitakse leida EC_x hinnanguline väärtus, tuleks katses kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja iga kontsentratsiooni kohta vähemalt kolme paralleelproovi; kontrollrühmas esineva varieeruvuse täpsemaks hindamiseks soovitatakse kontrollproovide puhul ja lahusti kasutamise korral ka lahustiga kontrollproovide puhul kasutada kuut paralleeli. Usaldusväärse mudelipõhise hinnangulise väärtuse saamiseks on kõikidel juhtudel soovitatav kasutada piisavat arvu katsekontsentratsioone. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui kaks (erandi võib teha juhul, kui kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera tõus on lauge). Paralleelproovide arvu igal kontsentratsioonil võib vähendada, kui suurendatakse selliste katsekontsentratsioonide arvu, mille puhul mõju ulatus on 5–95 %. Paralleelproovide arvu suurendamise või katsekontsentratsioonide intervalli vähendamise korral muutub usaldusvahemik tavaliselt kitsamaks.

37. Kui soovitakse leida vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon, tuleks kasutada vähemalt viit katsekontsentratsiooni ja iga kontsentratsiooni kohta vähemalt nelja paralleelproovi (kontrollrühmas esineva varieeruvuse täpsemaks hindamiseks soovitatakse kontrollproovide puhul ja lahusti kasutamise korral ka lahustiga kontrollproovide puhul kasutada kuut paralleeli) ning kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui kaks. Teave käesolevat katsemeetodit käsitlevas võrdlusuuringus hüpoteesi kontrollimise käigus arvutatud statistilise võimsuse kohta on esitatud 6. liites.

38. Kui võib eeldada (nt kontsentratsioonivahemiku leidmiseks tehtud eelkatse põhjal), et kemikaal ei avalda kuni kontsentratsioonini 1 000 mg sette kuivmassi kilogrammi kohta mingit mõju, või kui ühest kontsentratsioonist piisab huvipakkuva täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramiseks, võib teha piirsisalduskatse, mis hõlmab ühte katsekontsentratsiooni ja kontrollproove. Sellisel juhul tuleks katseprotokollis esitada piirkontsentratsiooni valimise üksikasjalik põhjendus. Piirsisalduskatse eesmärk on määrata kontsentratsioon, mis on piisavalt suur, et võimaldada otsustajatel välistada kemikaali võimalik mürgine mõju, ning piirsisaldusena sätestatakse kontsentratsioon, mida eeldatavalt üheski olukorras ei saavutata. Soovitatakse kasutada kontsentratsiooni 1 000 mg kuivmassi kilogrammi kohta. Tavaliselt on nii uuritava kemikaaliga rühmas kui ka kontrollrühmas vaja kasutada vähemalt kuut paralleelproovi. Teave käesolevat katsemeetodit käsitlevas võrdlusuuringus hüpoteesi kontrollimise käigus arvutatud statistilise võimsuse kohta on esitatud 6. liites.

Kokkupuutetingimused

Katseorganismid

39. Katses kasutatakse iga bioloogiliste näitajate määramiseks kasutatava proovi kohta vähemalt 10 ussi. See vastab umbes 50–100 milligrammile märjale biomassile. Kuivmassi eeldatava 17,1-protsendilise osakaalu puhul (48) vastab see umbes 9–17 milligrammile kuivale biomassile nõu kohta. USA Keskkonnakaitseameti 2000. aasta dokumendis (7) soovitatakse kasutada

▼M6

usside kogust, mille puhul kuiva biomassi ja orgaanilise süsiniku üldsisalduse vahekord ei oleks suurem kui 1:50. Punktis 22 kirjeldatud valmistatud sette puhul vastab see 2,0-protsendilise orgaanilise süsiniku üldsisaldusega sette kuivmassile umbes 43 grammi 10 ussi kohta. Kui kasutatakse rohkem kui 10 ussi nõu kohta, tuleks sette ja selle kohal oleva vee kogust vastavalt suurendada.

40. Kõik samas katses kasutatavad ussid peaksid olema sama päritoluga ja sarnases füsioloogilises seisundis (vt 5. liide). Tuleks valida umbes ühesuurused ussid (vt punkt 39). Enne katse algust soovitatakse võtta kaalumiseks usside partiist või tüvikultuurist osaproov, et hinnata usside keskmist kaalu.

41. Katses kasutatavad ussid eemaldatakse kultuurist (üksikasjalik teave on esitatud 5. liites). Suured (täiskasvanud) loomad, kellel ei täheldata hiljutise fragmenteerumise märke, viiakse puhast vett sisaldavatesse klaasnõudesse (nt Petri tassidesse). Seejärel usside elutegevus sünkroonitakse, nagu on kirjeldatud 5. liites. Pärast 10–14 ööpäeva kestvat regenereerumist tuleks katse jaoks valida sarnase suurusega terved täispikad ussid, kes reageerivad nõrgale mehaanilisele ärritajale aktiivse ujumise või roomamisega. Kui katsetingimused erinevad kultiveerimistingimustest (nt temperatuuri, valgusrežiimi või sette kohal oleva vee omaduste poolest), peaks usside kohandamiseks katsetingimustega piisama näiteks 24 tunni pikkusest kohanemisperioodist katses kasutataval temperatuuril ja valgusrežiimil ning samas vees, mida kasutatakse katses. Katsetingimustega kohanenud väheharjasussid tuleks juhuslikkuse alusel katsenõudesse jaotada.

Söötmine

42. Ussidele ei anta katse käigus lisasööta, kuna sööt lisatakse settele juba enne uuritava kemikaaliga töötlemist või sellega samaaegselt.

Valgus ja temperatuur

43. Valgustusperiood on kultuuris ja katse vältel tavaliselt 16 tundi (3, 7). Tuleks kasutada väikest valgustustihedust (nt 100–500 luksi), et jäljendada settepinnale iseloomulikke looduslikke tingimusi, ning selle väärtust tuleks kokkupuuteperioodi vältel mõõta vähemalt ühel korral. Temperatuur peaks olema kogu katse vältel 20 ± 2 °C. Samal temperatuuri mõõtmise päeval ei tohiks katsenõude vaheline temperatuurierinevus olla suurem kui ± 1 °C. Katsenõude paigutus inkubaatoris või katsepinnal peaks olema juhuslik, näiteks selleks, et minimeerida nõude paigutusest tulenevaid erinevusi sigivuse määras.

Aereerimine

44. Katsenõudes sette kohal olevat vett tuleks kergelt aereerida (nt 2–4 mulli sekundis), kasutades Pasteuri pipetti, mis jääb settepinnast umbes 2 cm kõrgusele, et setet võimalikult vähe häirida. Tuleks jälgida, et lahustunud hapniku sisaldus ei langeks alla 30 % õhu küllastuskontsentratsioonist. Õhu juurdevoolu tuleks kontrollida ja vajaduse korral reguleerida tööpäeviti vähemalt kord päevas.

Veekvaliteedi mõõtmine

45. Sette kohal asuvas vees tuleks määrata järgmised veekvaliteedi näitajad.

Temperatuur:	kord nädalas ning kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt ühes katsenõus iga kontsentratsiooni ja kontrollrühma kohta; peale selle võib võimaluse korral mõõta näiteks iga tunni järel ümbritseva keskkonna (õhu või veevanni vee) temperatuuri.

▼M6

Lahustunud hapniku sisaldus:	kord nädalas ning kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt ühes katsenõus iga kontsentratsiooni ja kontrollrühma kohta; väljendatakse milligrammides liitri kohta ja protsentuaalse osakaaluna õhu küllastuskontsentratsioonist.
Õhu juurdevool:	tuleks kontrollida ja vajaduse korral reguleerida tööpäeviti vähemalt kord päevas.
pH:	kord nädalas ning kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt ühes katsenõus iga kontsentratsiooni ja kontrollrühma kohta.
Vee üldkaredus:	kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt ühes kontrollrühma paralleelnõus ja ühes suurima kontsentratsiooniga katsenõus; väljendatakse $CaCO_3$ sisaldusena milligrammides liitri kohta.
Ammoniaagi üldsisaldus:	kokkupuuteperioodi alguses ja seejärel 3 korda nädalas vähemalt ühes kontrollrühma paralleelnõus ja ühes katsenõus iga kontsentratsiooni kohta; väljendatakse NH_4^+ või NH_3 sisaldusena või ammoniaaklämmastiku üldsisaldusena milligrammides liitri kohta.

Kui veekvaliteedi näitajate mõõtmiseks on vaja nõudest eemaldada märkimisväärses koguses vett, võib olla soovitatav kasutada veekvaliteedi mõõtmiseks eraldi nõusid, et vee ja sette ruumalasuhe jääks muutumatuks.

Bioloogilised vaatlused

46. Katsenõusid tuleks kokkupuuteperioodi vältel jälgida, et hinnata visuaalselt muutusi usside käitumises, võrrelduna käitumisega kontrollrühmas (nt sette vältimine, nähtavad väljaheitegraanulid settepinnal). Vaatluste tulemused tuleks registreerida.

47. Katse lõpus hinnatakse tulemusi igas paralleelnõus (keemiliseks analüüsiks ette nähtud lisanõud võib vaatluse alt välja jätta). Katsenõust usside eemaldamiseks tuleks kasutada sobivat meetodit. Tuleks jälgida, et ükski uss ei saaks eemaldamise käigus vigastada. Üks võimalik meetod on usside väljasõelumine settest. Selleks võib kasutada sobiva ava suurusega roostevabast terasest sõela. Enamik sette kohal olevast veest kallatakse ettevaatlikult ära ning allesjäänud setet ja vett loksutatakse, et tekiks suspensioon, mille saab läbi sõela lasta. Kui kasutatakse sõela, mille ava suurus on 500 μm, läbib valdav osa setteosakestest sõela väga kiiresti, kuid sõelumine tuleks kiiresti lõpule viia, et hoida ära usside roomamist sõela sisse või läbi selle. Kui kasutatakse sõela, mille ava suurus on 250 μm, ei rooma ussid sõela sisse ega sellest läbi, kuid tuleks jälgida, et sõelale jääks võimalikult vähe setteosakesi. Igast paralleelnõust pärit sõelutud suspensiooni võib veel teist korda läbi sõeluda, et tagada kõikide usside eemaldamine. Teise võimalusena võib kasutada meetodit, mille puhul katsenõud paigutatakse sette soojendamiseks veevanni, mille temperatuur on 50–60 °C; ussid lahkuvad settest ja need saab leegis töödeldud laia suuga pipeti abil settepinnalt kokku koguda. Veel ühe võimaliku meetodina võib tekitada settesuspensiooni ja kallata selle sobiva suurusega madalasse kaussi. Ussid saab madalast suspensioonikihist välja korjata, kasutades terasnõela või kellassepapintsette (neid kasutatakse pigem kahvlina kui tangidena, et hoida ära usside vigastamist), ning puhtasse vette paigutada. Pärast usside eraldamist settesuspensioonist loputatakse neid katselahusega ja ussid loendatakse.

48. Tuleks tõendada, et labori töötajad on kasutatavast meetodist olenemata võimelised saama kätte vähemalt 90 % kõigist settes leiduvatest organismi-

▼M6

dest.
Näiteks võib kontrollrühmas või katserühmas kasutatavale settele lisada teatud kindla arvu katseorganisme ja määrata 1 tunni pärast kättesaadud usside osakaalu (7).

49. Tuleks määrata ja registreerida elus ja surnud isendite üldarv paralleelnõu kohta. Surnuks loetakse ussid, kes kuuluvad ühte järgmistest rühmadest:

a) ussid, kes ei reageeri nõrgale mehaanilisele ärritajale;

b) ussid, kellel täheldatakse lagunemise tundemärke (koos alapunktis a kirjeldatuga);

c) puuduvad ussid.

Elus ussid võib jagada järgmisse kolme rühma:

a) suured (täiskasvanud) terviklikud ussid, kellel puuduvad regenereerunud kehapiirkonnad;

b) terviklikud ussid, kellel esineb heledamaid regenereerunud kehapiirkondi (st ussid, kellel on uus eesosa, uus tagaosa või nii üks kui ka teine);

c) ussid, kes ei ole terviklikud (st äsja fragmenteerunud ussid, kellel puuduvad regenereerunud kehapiirkonnad).

Kõnealuste lisatähelepanekute tegemine ei ole kohustuslik, kuid neid saab kasutada bioloogiliste vaatluste tulemuste täpsemaks tõlgendamiseks (näiteks võib rühma c kuuluvate usside suur arv viidata tavapärasest hilisemale paljunemisele või regenereerumisele asjaomase kemikaaliga nõudes). Peale selle tuleks registreerida kõik kemikaaliga kokku puutuvate usside välimuses täheldatavad erinevused kontrollrühma usside välimusega võrreldes (nt nahakahjustuste või turses kehapiirkondade esinemine).

50. Igast paralleelnõust leitud elus ussid asetatakse kohe pärast loendamist/hindamist eelnevalt kaalutud kuivale märgistatud kaalukausile (üks iga paralleelproovi kohta) ning ussid surmatakse ühe tilga etanooliga kaalukausi kohta. Kaalukausid pannakse kuivatuskappi temperatuurile 100 ± 5 °C, ussidel lastakse öö läbi kuivada ning pärast eksikaatoris jahutamist määratakse kaalumise teel usside kuivmass (väljendatuna soovitatavalt grammides täpsusega vähemalt 4 kohta pärast koma).

51. Peale üldise kuivmassi võib määrata ka tuhavaba materjali kuivmassi, nagu on kirjeldatud allikas 49, et võtta arvesse usside seedekulglas olevast allaneelatud settest pärit anorgaanilisi koostisaineid.

52. Arvutatav biomass on määratletud kui täiskasvanud ja noori usse hõlmav üldine biomass paralleelproovi kohta. Paralleelproovi biomassi määramisel ei tohiks võtta arvesse surnud usse.

Uuritava kemikaali sisalduse kontrollimine

Proovide võtmine

53. Proovid uuritava kemikaali keemilise analüüsi tegemiseks tuleks võtta vähemalt suurimal kasutataval kontsentratsioonil ja ühel väiksemal kontsentratsioonil vähemalt tasakaalustusetapi lõpus (enne katseorganismide lisamist) ja katse lõpus. Analüüsimiseks tuleks proovid võtta vähemalt sette koondproovist ja selle kohal olevast veest. Igal proovivõtukuupäeval tuleks võtta vähemalt kaks proovi analüüsitava keskkonna ja kontsentratsiooni kohta. Ühte kahest proovist võib säilitada varuproovina (analüüsitakse juhul, kui algse

▼M6

analüüsi tulemused jäävad väljapoole vahemikku ± 20 % nominaalsest sisaldusest). Kemikaali eriomadustest lähtuvalt – näiteks kui kemikaali lagunemine on eeldatavalt kiire – võib analüüsiplaani eksperdihinnangu alusel muuta (nt sagedasem proovivõtt, analüüsimine suuremal arvul kontsentratsioonidel). Sel juhul võib võtta proove ka vahepealsetel proovivõtukuupäevadel (nt kokkupuuteperioodi seitsmendal päeval).

54. Sette kohal olevast veest proovi võtmiseks tuleks vesi ettevaatlikult ära kallata või nõust välja juhtida, et setet võimalikult vähe häirida. Proovi maht tuleks registreerida.

55. Pärast sette kohal oleva vee eemaldamist tuleks sete homogeniseerida ja sobivasse nõusse tõsta. Registreeritakse märja sette kaal.

56. Kui on vaja analüüsida uuritava kemikaali sisaldust ka poorides olevas vees, tuleks homogeniseeritud ja kaalutud setteproovi poorivee eraldamiseks tsentrifuugida. Näiteks võib 250-milliliitrise mahuga tsentrifuugitopsid täita umbes 200 ml märja settega. Seejärel tuleks proove poorivee eraldamiseks ilma filtrimata tsentrifuugida näiteks 30–60 minutit kiirendusel 10 000 ± 600 *g* temperatuuril, mis ei ületa katses kasutatavat temperatuuri. Pärast tsentrifuugimist kallatakse supernatant ära või eemaldatakse pipeti abil, jälgides, et sellesse ei satuks setteosakesi, ning registreeritakse selle maht. Registreeritakse allesjäänud sadenenud sette kaal. Et hõlbustada uuritava kemikaali massibilansi või sisalduse hindamist süsteemis sete/vesi, võib määrata sette kuivmassi igal proovivõtukuupäeval. Mõnel juhul ei pruugi kemikaali sisalduse määramine poorivees proovi liiga väikese mahu tõttu võimalik olla.

57. Kui proove ei ole võimalik analüüsida kohe, tuleks nende säilitamiseks kasutada sobivat meetodit, näiteks soovitatavaid säilitustingimusi, mille puhul asjaomase uuritava kemikaali lagunemine on minimaalne (nt keskkonnaproove säilitatakse tavaliselt – 18 °C juures pimedas). Teave asjaomase uuritava kemikaali õigete säilitustingimuste, näiteks säilitamise kestuse ja temperatuuri, ekstraheerimismeetodite jms kohta tuleb hankida enne katse alustamist.

Analüüsimeetod

58. Kuna uuritava kemikaali määramiseks kasutatava analüüsimeetodi usaldusväärsus sõltub peamiselt meetodi mõõtetäpsusest, kordustäpsusest ja tundlikkusest, tuleb katseliselt kontrollida, kas keemilise analüüsi täpsus ja reprodutseeritavus ning uuritava kemikaali mõõdetud sisaldus vee- ja setteproovides on asjaomase meetodi puhul vähemalt suurimal ja väikseimal kasutataval kontsentratsioonil rahuldav. Samuti kontrollitakse, et uuritav kemikaal ei oleks kontrollnõudes tuvastatav määramispiirist suuremas kontsentratsioonis. Vajaduse korral parandatakse nominaalse sisalduse väärtust vastavalt kvaliteedikontrolli eesmärgil proovile lisatud kemikaali mõõdetud sisaldusele (nt kui mõõdetud sisaldus jääb väljapoole vahemikku 80–120 % lisatud kogusest). Kõiki proove tuleks kogu katse vältel käidelda nii, et saastumine ja uuritava kemikaali kadu (näiteks proovivõtuseadmele adsorbeerumise tõttu) oleks minimaalne.

59. Tuleks registreerida ja esitada uuritava kemikaali mõõdetud sisaldus, määramispiir ning settes ja vees tuvastamise alampiir.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

60. Katsest saadavad peamised kohustuslikud statistiliselt hinnatavad uuritavad muutujad on biomass ja usside üldarv paralleelproovi kohta. Peale selle võib hinnata ka sigivust (usside arvu suurenemine) ja kasvu (kuiva biomassi suurenemine). Sellisel juhul tuleks teha kindlaks usside hinnanguline kuivmass kokkupuuteperioodi alguses, näiteks nii, et mõõdetakse katses kasutatavate sünkroonitud usside partiist võetud representatiivse osaproovi kuivmass.

▼M6

61. Ehkki suremust ei kasutata käesoleva katsemeetodi puhul lõppnäitajana, tuleks võimaluse korral hinnata siiski ka suremust. Suremuse hindamisel tuleks surnuks lugeda ussid, kes ei reageeri nõrgale mehaanilisele ärritajale või kellel täheldatakse lagunemise tundemärke, samuti puuduvad ussid. Suremus tuleks vähemalt registreerida ja seda katsetulemuste tõlgendamisel arvesse võtta.

62. Kontsentratsiooni, mille puhul mõju avaldub teatud kindlal määral, tuleks väljendada milligrammides sette kuivmassi kilogrammi kohta. Kui uuritava kemikaali mõõdetud sisaldus settes või settes ja selle kohal olevas vees on kokkupuuteperioodi alguses 80–120 % nominaalsest sisaldusest, võib asjaomast kontsentratsiooni (EC_x, NOEC või LOEC) väljendada lähtuvalt nominaalsest sisaldusest. Kui mõõdetud sisaldus erineb nominaalsest sisaldusest enam kui ± 20 % võrra, tuleks eespool nimetatud asjaomase kontsentratsiooni väljendamisel lähtuda kokkupuuteperioodi alguses mõõdetud algsisaldusest, võttes näiteks arvesse uuritava kemikaali massibilanssi katsesüsteemis (vt punkt 30). Sellisel juhul saab lisateabe hankimiseks analüüsida põhilahust ja/või töötlemiseks kasutatavaid lahuseid, et veenduda, et katses kasutatavad setteproovid on valmistatud õigesti.

EC_x

63. Punktis 60 kirjeldatud näitajaid iseloomustavad EC_x väärtused arvutatakse asjakohaste statistiliste meetoditega (nt probitanalüüs, logistiline või Weibulli funktsioon, kohandatud Spearmani-Kärberi meetod või lihtne interpoleerimine). Statistilise hindamise juhised on esitatud allikates 15 ja 50. EC_x leidmiseks sisestatakse kasutatavasse võrrandisse kontrollproovide keskväärtusest x % moodustav väärtus. EC_{50} või mõne muu EC_x arvutamiseks tuleks kasutatud kontsentratsioonidele vastavate keskmiste ($\overline{X}$) suhtes kohaldada regressioonanalüüsi.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC)

64. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha kindlaks NOEC või LOEC, on vaja statistilisi andmeid iga nõu kohta (eraldi nõusid käsitletakse paralleelproovidena). Tuleks kasutada asjakohaseid statistilisi meetodeid. Et hinnata uuritava kemikaali pärssivat mõju kontrollrühmaga võrreldes, kasutatakse üldjuhul hüpoteesi ühepoolset (väiksemamahulist) kontrollimist p väärtusel $\leq 0{,}05$. Sellekohased näited on esitatud järgmistes punktides. Asjakohaste statistiliste meetodite valimise juhised on esitatud allikates 15 ja 50.

65. Andmete normaaljaotust saab kontrollida näiteks andmete mudeliga sobivuse hindamiseks kasutatava Kolmogorovi-Smirnovi testi, variatsiooniulatuse ja standardhälbe suhtel põhineva testi või Shapiro-Wilki testiga (kahepoolne, $p \leq 0{,}05$). Hajuvuse homogeensuse kontrollimiseks võib kasutada Cochrani, Levene'i või Bartletti testi (kahepoolne, $p \leq 0{,}05$). Kui parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, hajuvuse homogeensus) on täidetud, võib kasutada ühepoolset dispersioonanalüüsi ja seejärel mitmese võrdluse teste. Et teha kindlaks, kas kontrollrühm ja uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidele vastavad katserühmad on üksteisest oluliselt erinevad ($p \leq 0{,}05$), võib kasutada paariviisilist võrdlemist (nt Dunnetti t-testi) või muutujate sammuviisilise elimineerimisega trenditesti (nt Williamsi testi). Et määrata NOEC ja LOEC, tuleks kasutada mitteparameetrilist meetodit (nt Bonferroni U-testi vastavalt Holmile või Jonckheere'i-Terpstra trenditesti).

Piirsisalduskatse

66. Kui on tehtud piirsisalduskatse (kontrollrühma võrdlemine ainult ühele kontsentratsioonile vastava katserühmaga) ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeensus) on täidetud, võib arvulise tunnuse (usside üldarv ja usside kuivmassina väljendatav biomass) analüüsimiseks kasutada Studenti t-testi. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testi (Welchi t-test) või mitteparameetrilist testi, näiteks Manni-Whitney U-testi. Teave käesolevat katsemeetodit käsitlevas võrdlusuuringus hüpoteesi kontrollimise käigus arvutatud statistilise võimsuse kohta on esitatud 6. liites.

▼M6

67. Kontrollrühmade (lahustita ja lahustiga kontrollproovide) vaheliste oluliste erinevuste kindlakstegemiseks võib kummagi kontrollrühma paralleelproove analüüsida piirsisalduskatse puhul kirjeldatud viisil. Kui kõnealuste testidega ei tuvastata olulisi erinevusi, võib kõikide lahustita ja lahustiga kontrollproovide andmed ühte koondada. Vastasel juhul tuleks kõikide katserühmade andmeid võrrelda lahustiga kontrollproovide andmetega.

Tulemuste tõlgendamine

68. Kui esineb kõrvalekaldeid käesolevast katsemeetodist ja katsekontsentratsioonide puhul jäävad mõõdetud kontsentratsioonid kasutatava analüüsimeetodi määramispiiri lähedale, tuleks olla tulemuste tõlgendamisel ettevaatlik. Kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist tuleb registreerida.

Katseprotokoll

69. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

— *Uuritav kemikaal:*

— kemikaali identifitseerimisandmed (tavanimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sealhulgas puhtus ja kemikaali kvantitatiivse analüüsi meetod; kemikaali päritolu ning lahusti kasutamise korral lahusti identifitseerimisandmed ja kontsentratsioon;

— kõik katse eel kogutud kättesaadavad andmed kemikaali füüsikaliste ja füüsikalis-keemiliste omaduste kohta (nt lahustuvus vees, aururõhk, jaotuskoefitsient mullas (või andmete olemasolu korral settes), log K_{ow}, püsivus vees jne).

— *Katseliik:*

— teaduslik nimetus, päritolu, kõik eeltöötlused, kohandamine, kultiveerimistingimused jne.

— *Katsetingimused:*

— kasutatud katserežiim (nt staatiline, poolstaatiline või läbivoolurežiim);

— katseplaan (nt katsenõude arv, materjal ja suurus, vee maht nõu kohta (poolstaatilise ja läbivoolurežiimi puhul veekoguse vahetumiskiirus), sette mass ja maht nõu kohta, katse eel ja ajal kasutatavad aereerimistingimused, paralleelproovide arv, usside arv paralleelproovi kohta kokkupuuteperioodi alguses, katsekontsentratsioonide arv, kohandamis-, tasakaalustus- ja kokkupuuteperioodi kestus, proovivõtusagedus);

— settekihi ja selle kohal oleva veekihi paksus;

— uuritava kemikaali eeltöötluseks ja proovile lisamiseks kasutatud meetod;

— nominaalsed katsekontsentratsioonid, keemilise analüüsi jaoks proovide võtmise üksikasjalik kirjeldus ja uuritava kemikaali sisalduse määramiseks kasutatud analüüsimeetodid;

— sette omadused vastavalt punktides 24–25 kirjeldatule ja kõik muud mõõtmistulemused; kunstliku sette valmistamine;

— katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (hapnikusisaldus, pH, elektrijuhtivus, karedus ja kõik muud mõõtmistulemused) enne katse algust;

— üksikasjalik teave söötmise kohta, sealhulgas sööda liik, selle valmistamine, kogus ja söötmisrežiim;

▼**M6**

— valgustustihedus ja valgustusperiood(id);

— kõik meetodid, mille abil on määratud bioloogilised näitajad (nt katseorganismide proovide võtmine, nende vaatlemine ja kaalumine) ja abiootilised näitajad (nt vee ja sette kvaliteedinäitajad);

— kõikide keemiliseks analüüsiks võetud proovide maht ja/või kaal;

— üksikasjalik teave kõikide keemiliseks analüüsiks võetud proovide töötlemise kohta, sealhulgas andmed uuritava kemikaali valmistamise, säilitamise, rikastamise, ekstraheerimise ja analüüsimise meetodite (ja nende täpsuse) kohta ning uuritava kemikaali mõõdetud sisalduse kohta.

— *Tulemused:*

— katsenõudes oleva vee kvaliteet (pH, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, karedus, ammoniaagisisaldus ja kõik muud mõõtmistulemused);

— sette orgaanilise süsiniku üldsisaldus, kuivmassi ja märgmassi suhe, pH ja kõik muud mõõtmistulemused;

— katse lõpus igas katsenõus loendatud usside üldarv ning samuti terviklike ja mittetervikliike usside arv, kui see määrati;

— usside kuivmass igas katsenõus katse lõpus ja kui see määrati, siis ka usside osaproovi kuivmass katse alguses;

— kõik ebanormaalse käitumise ilmingud kontrollrühmaga võrreldes (nt sette vältimine, väljaheitegraanulite esinemine või puudumine);

— kõik suremust käsitlevad vaatlustulemused;

— mürgisuse lõppnäitajate (nt EC_x, NOEC ja/või LOEC) hinnanguline väärtus ja selle leidmiseks kasutatud statistilised meetodid;

— nominaalsed katsekontsentratsioonid, mõõdetud katsekontsentratsioonid ja kõikide selliste analüüside tulemused, millega määrati uuritava kemikaali kontsentratsioon katsenõus;

— kõik kõrvalekalded nõuetekohasuse kriteeriumidest.

— *Tulemuste hindamine:*

— tulemuste vastavus punktis 13 loetletud nõuetekohasuse kriteeriumidele;

— tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

(1) EÜ (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I–IV. Euroopa Ühenduste Ametlike Väljaannete Talitus, Luksemburg.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. Väljaandes: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. Väljaandes: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A., ja Mattson, V. R. (1993). Use of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ. Toxicol. Chem*. 12: 269–279.

(6) Käesoleva lisa peatükk C.27 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud sette kasutamisega".

(7) USA Keskkonnakaitseamet (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Teine väljaanne. EPA 600/R-99/064, USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN, märts 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Aruanne SPE 1/RM/32. Detsember 1997.

(9) Hill, I. R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (toim.) (1993). Guidance Document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Seminarilt „SETAC Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment", 8.–10. november 1993, Renesse, Madalmaad.

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Toim. Streloke, M., ja Köpp, H. Berliin, 1995.

(11) Riedhammer, C., ja Schwarz-Schulz, B. (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. *J. Soils Sediments* 1: 105–110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. USA Materjalide Katsetamise Ühing, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., ja Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. Koostöös R. Nageli ja B. Karaoglaniga. Aruanne Saksamaa Keskkonnaametile (Umweltbundesamt, Berliin), teadus- ja arendustegevuse projekt nr 202 67 429.

(14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, viies kavand, märts 2003; aruanne EPS 1/RM/.

(16) Nikkilä, A., Halme, A., ja Kukkonen, J. V. K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. *Chemosphere* 51: 35–46.

(17) Baily, H. C., ja Liu, D. H. W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. Lk 205–215. Väljaandes: Eaton, J. C., Parrish, P. R., ja Hendricks, A. C. (toim.), Aquatic Toxicology. ASTM STP 707. USA Materjalide Katsetamise Ühing.

▼**M6**

(18) Chapman, K. K., Benton, M. J., Brinkhurst, R. O., ja Scheuerman, P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. *Environ. Toxicol*. 14: 271–278.

(19) Meyer, J. S., Boese, C. J., ja Collyard, S. A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. *Comp. Biochem. Phys. C* 133: 99–109.

(20) Schubauer-Berigan, M. K., Dierkes, J. R., Monson, P. D., ja Ankley, G. T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem*. 12: 1261–1266.

(21) West, C. W., Mattson, V. R., Leonard, E. N., Phipps, G. L., ja Ankley, G. T. (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. *Hydrobiologia* 262: 57–63.

(22) Ingersoll, C. G., Ankley, G. T., Benoit, D. A., Brunson, E. L., Burton, G. A., Dwyer, F. J., Hoke, R. A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J., ja Winger, P. V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. *Environ. Toxicol. Chem*. 14: 1885–1894.

(23) Kukkonen, J., ja Landrum, P. F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem*. 13: 1457–1468.

(24) Leppänen, M. T., ja Kukkonen, J. V. K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem*. 17: 2196–2202.

(25) Leppänen, M. T., ja Kukkonen, J. V. K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183–194.

(26) Landrum, P. F., Gedeon, M. L., Burton, G. A., Greenberg, M. S., ja Rowland, C. D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Con. Tox*. 42: 292–302.

(27) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J., ja Kemble, N. E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Con. Tox*. 35: 191–201.

(28) Ingersoll, C. G., Brunson, E. L., Wang, N., Dwyer, F. J., Ankley, G. T., Mount, D. R., Huckins, J., Petty, J., ja Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem*. 22: 872–885.

(29) Rodriguez, P., ja Reynoldson, T. B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. Väljaandes: Mudroch, A., Azcue, J. M., ja Mudroch, P. (toim.), Manual of bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph., Oehlmann, J., ja Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59: 271–280.

(31) Brust, K., Licht, O., Hultsch, V., Jungmann, D., ja Nagel, R. (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chem*. 20: 2000–2007.

(32) Oetken, M., Ludwichowski, K.-U., ja Nagel, R. (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-Altstoff-V. Saksamaa Keskkonnaameti (Umweltbundesamt, Berliin) tellimusel; FKZ 360 12 001, märts 2000.

▼**M6**

(33) Leppänen, M. T., ja Kukkonen, J. V. K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Technol*. 32: 1503–1508.

(34) Dermott, R., ja Munawar, M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 235/236: 407–414.

(35) Drewes, C. D., ja Fourtner, C. R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Dev. Biol*. 138: 94–103.

(36) Brinkhurst, R. O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshwater Biological Association, Scientific Publication No. 22.

(37) Käesoleva lisa peatükk C.1 „Äge mürgisus kaladele".

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Pariis.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G., ja Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* 35: 835–852.

(40) Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R., ja Streit, B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. Environ. Safe*. 39: 10–20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C., ja Studinger, G. (1999). Seminar „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.–27.04.1999, Hochheim/Main, Saksamaa. Aruanne teadus- ja arendustegevuse projekti nr 298 67 419 kohta, Umweltbundesamt, Berliin.

(42) Suedel, B. C., ja Rodgers, J. H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem*. 13: 1163–1175.

(43) Naylor, C., ja Rodrigues, C. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291–3303.

(44) Kaster, J. L., Klump, J. V., Meyer, J., Krezoski, J., ja Smith, M. E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11: 181–184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J. I., ja Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8: 111–124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P. F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Technol*. 23: 588–595.

(48) Brooke, L. T., Ankley, G. T., Call, D. J., ja Cook, P. M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem*. 15: 223–228.

(49) Mount, D. R., Dawson, T. D., ja Burkhard, L. P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem*. 18: 1244–1249.

▼M6

(50) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Pariis, Prantsusmaa.

(51) Liebig, M., Meller, M., ja Egeler, P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Veranstaltungen 5/2004: Statusseminar – Sedimentkontakttests. 24.–25. märts 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Saksamaa. Lk 107–119.

Täiendavad kirjandusallikad statistiliste meetodite kohta

Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc*. 50: 1096–1121.

Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.

Finney, D. J. (1971). Probit Analysis (3. väljaanne), lk 19–76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M. A., Russo, R. C., ja Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol*. 11: 714–719; parandus: *Environ. Sci. Technol*. 12 (1978): 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat*. 6: 65–70.

Sokal, R. R., ja Rohlf, F. J. (1981). Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 2. väljaanne. W. H. Freeman and Company, New York.

Miller, R. G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons, New York.

Shapiro, S. S., ja Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591–611.

Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.

Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519–531.

▼M6

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Kemikaal – aine või segu.

Kohandamisperiood – periood, mille jooksul lastakse sette koostises olevatel mikroobipopulatsioonidel stabiliseeruda ja kõrvaldatakse näiteks sette koostisosadest pärit ammoniaak; see toimub enne settele uuritava kemikaali lisamist. Tavaliselt eemaldatakse kohandamisperioodi lõpus sette kohal olev vesi.

EC_x – settes sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul bioloogilisele näitajale avalduva mõju ulatus on kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul X % (nt 50 %).

Tasakaalustusperiood – periood, mille jooksul lastakse uuritaval kemikaalil jaotuda tahke faasi, poorivee ja sette kohal oleva vee vahel; see toimub pärast settele uuritava kemikaali lisamist ja enne katseorganismide lisamist.

Kokkupuuteperiood – aeg, mille vältel katseorganismid puutuvad kokku uuritava kemikaaliga.

Valmistatud sete *(ehk taastatud, kunstlik või sünteetiline sete)* – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette koostisosade imiteerimiseks.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon – uuritava kemikaali väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali olulist ($p \leq 0,05$) mürgist mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peab kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil avalduv kahjulik mõju. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleb lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) on valitud.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ($p \leq 0,05$) mõju ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähimat täheldatavat toimet avaldavat kontsentratsiooni.

Jaotuskoefitsient süsteemis oktanool/vesi *(K_{ow}; mõnikord kasutatakse ka tähist P_{ow})* – *n*-oktanoolis lahustunud kemikaali ja vees lahustunud kemikaali tasakaalukontsentratsioonide suhe, millega iseloomustatakse kemikaali lipofiilsust (käesoleva lisa peatükk A.24). Koefitsienti K_{ow} või selle logaritmi (log K_{ow}) kasutatakse näitajana, mis võimaldab hinnata kemikaali veeorganismides bioakumuleerumise tõenäosust.

Jaotuskoefitsient süsteemis orgaaniline süsinik/vesi *(K_{oc})* – sette orgaanilise süsiniku fraktsioonis ja selle pinnal esineva kemikaali ning vees lahustunud kemikaali tasakaalukontsentratsioonide suhe.

Sette kohal olev vesi – katsenõus setet kattev veekiht.

Poorivesi – sette- või mullaosakeste vahelist ruumi täitev vesi.

Rikastatud sete – sete, millele on lisatud uuritavat kemikaali.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼**M6**

2. liide

Soovitatava taastatud vee koostis

(käesoleva lisa peatüki C.1 (1) põhjal)

a) *Kaltsiumkloriidi lahus*

11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini.

b) *Magneesiumsulfaadi lahus*

4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini.

c) *Naatriumvesinikkarbonaadi lahus*

2,59 g $NaHCO_3$ lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini.

d) *Kaaliumkloriidi lahus*

0,23 g KCl lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini.

Kõik kemikaalid peavad olema analüütilise puhtusastmega.

Destilleeritud või deioniseeritud vee elektrijuhtivus ei tohiks ületada väärtust 10 $\mu S\ cm^{-1}$.

Võetakse 25 ml iga lahust a–d ja segatakse omavahel ning saadud lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Kaltsiumi- ja magneesiumiioonide summaarne sisaldus sellises lahuses on 2,5 mmol/l.

Kaltsiumi- ja magneesiumiioonide suhe lahuses on 4:1 ning naatriumi- ja kaaliumiioonide suhe 10:1. Kõnealuse lahuse happeneutraliseerimisvõime $K_{S4,3}$ on 0,8 mmol/l.

Lahjendusvett aereeritakse seni, kuni saavutatakse hapniku küllastuskontsentratsioon, ning seejärel lastakse sel enne kasutamist umbes kaks ööpäeva aereerimata seista.

VIIDE

(1) Käesoleva lisa peatükk C.1 „Äge mürgisus kaladele”.

▼**M6**

3. liide

Nõuetekohase lahjendusvee füüsikalis-keemilised omadused

Koostisaine	Kontsentratsioon
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 µg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	< 25 ng/l
(OECD 1992. aasta juhendi (1) põhjal)	

VIIDE

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Pariis.

▼M6

4. liide

Soovitatav kunstlik sete – valmistamis- ja säilitamisjuhised

Sette koostisosad

Koostisosa	Kirjeldus	Protsentuaalne osakaal sette kuivmassist
Turvas	Turbasamblaturvas, keskmise lagunemisastmega, õhu käes kuivatatud, nähtavate taimejäänusteta, peeneks jahvatatud (osakeste suurus ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Kvartsliiv	Tera suurus ≤ 2 mm, kusjuures > 50 % osakestest peaks olema vahemikus 50–200 µm	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisisaldus ≥ 30 %	20 ± 1
Sööt	*Nt pulbristatud nõgeselehed (*folia urticae*), kõrvenõgese (*Urtica dioica*) peeneks jahvatatud lehed (osakeste suurus ≤ 0,5 mm), farmaatsiastandarditele vastavad, inimtarbimiseks ette nähtud; lisatakse kuivale settele*	0,4–0,5
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 ± 0,5
Kaltsiumkarbonaat	$CaCO_3$, pulbristatud, keemiliselt puhas; lisatakse kuivale settele	0,05–1
Deioniseeritud vesi	Elektrijuhtivus ≤ 10 µS/cm; lisatakse kuivale settele	30–50

Märkus: Kui võib eeldada, et ammoniaagisisaldus muutub tavapärasest suuremaks – näiteks kui on teada, et uuritav kemikaal pärsib nitrifitseerimist –, võib olla otstarbekas asendada 50 % lämmastikurikkast nõgeselehtede pulbrist tselluloosiga (nt keemiliselt puhta pulbrilise α-tselluloosiga osakeste suurusega ≤ 0,5 mm (1, 2)).

Valmistamine

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Tõhusa homogenisaatori abil valmistatakse vajaliku koguse turbapulbri suspensioon deioniseeritud vees. Selle suspensiooni pH reguleeritakse $CaCO_3$ abil väärtusele 5,5 ± 0,5. Suspensiooni hoitakse ettevaatlikult segades vähemalt kaks ööpäeva temperatuuril 20 ± 2 °C, et lasta pH-l ja mikroobipopulatsioonidel stabiliseeruda. Pärast seda määratakse pH uuesti; see peaks olema 6,0 ± 0,5. Seejärel segatakse turbasuspensioon muude koostisosadega (liiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH määratakse uuesti ja see reguleeritakse vajaduse korral $CaCO_3$ abil väärtusele 6,5–7,5. Kui võib eeldada ammoniaagi teket, võib olla otstarbekas hoida sette pH väärtus alla 7,0 (nt vahemikus 6,0–6,5). Settest võetakse proovid kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks. Kui võib eeldada ammoniaagi teket, võib valmistatud setet hoida enne uuritava kemikaali lisamist seitse ööpäeva samades tingimustes, mida kasutatakse järgnevas katses (nt sette ja vee suhe 1:4, settekihi paksus sama kui katsenõudes), st sete

▼M6

tuleks katta veekihiga, mida tuleks aereerida. Selle kohandamisperioodi lõpus tuleks sette kohal olev vesi eemaldada ja ära visata. Seejärel segatakse iga kontsentratsiooni puhul settesse uuritavat kemikaali sisaldav kvartsliiv, sete jaotatakse katses kasutatavatesse paralleelnõudesse ja kaetakse katseveega. Nõusid inkubeeritakse samades tingimustes, mida kasutatakse järgnevas katses. Sellega algab tasakaalustusperiood. Sette kohal olevat vett tuleks aereerida.

Valitud sööt tuleks lisada settele enne uuritava kemikaali lisamist või sellega samaaegselt. Sööda võib algselt segada turbasuspensiooniga (vt eespool). Sööda ulatuslikku lagunemist katseorganismide lisamise eel – näiteks pika tasakaalustusperioodi puhul – saab ära hoida, kui jätta sööda lisamise ja kokkupuuteperioodi alguse vahele võimalikult lühike ajavahemik. Et tagada uuritava kemikaali segunemine söödaga, tuleks sööt segada settega hiljemalt uuritava kemikaali settele lisamise päeval.

Säilitamine

Kunstliku sette kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas või toatemperatuuril. Uuritavat kemikaali sisaldav valmistatud sete tuleks katses viivitamata ära kasutada. Rikastatud mulla proove võib nende analüüsimiseni säilitada konkreetse uuritava kemikaali jaoks soovitatavates tingimustes.

VIITED

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., ja Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. Koostöös R. Nageli ja B. Karaoglaniga. Aruanne Saksamaa Keskkonnaametile (Umweltbundesamt, Berliin), teadus- ja arendustegevuse projekt nr 202 67 429.

(2) Liebig, M., Meller, M., ja Egeler, P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Veranstaltungen 5/2004: Statusseminar – Sedimentkontakttests. 24.–25. märts 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Saksamaa. Lk 107–119.

▼M6

5. liide

***Lumbriculus variegatus*'e kultiveerimise meetodid**

Alamklassi *Oligochaeta* sugukonda *Lumbriculidae* kuuluv *Lumbriculus variegatus* (Müller) elab mageveesettes ja on ökotoksikoloogilistes katsetes laialdaselt kasutusel. Seda liiki saab laboritingimustes hõlpsalt kultiveerida. Kultiveerimismeetodite ülevaade on esitatud allpool.

Kultiveerimismeetodid

Üksikasjaliku ülevaate *Lumbriculus variegatus*'e kultiveerimise tingimustest on esitanud Phipps *et al*. (1993) (1), Brunson *et al*. (1998) (2), USA Materjalide Katsetamise Ühing (2000) (3) ja USA Keskkonnakaitseamet (2000) (4). Allpool on esitatud nende tingimuste lühikokkuvõte. *L. variegatus*'e kasutamise oluline eelis on selle liigi isendite kiire paljunemine ja sellest tulenev kiire biomassi suurenemine laboris kultiveeritavates populatsioonides (nt allikad 1, 3, 4, 5).

Usse võib kasvatada suurtes akvaariumides (mahuga 57–80 l) temperatuuril 23 °C valgustusperioodiga 16 tundi valgust (100–1 000 luksi) ja 8 tundi pimedust, kasutades looduslikku vett, mida uuendatakse iga päev (45–50 l akvaariumi kohta). Substraadi valmistamiseks lõigatakse pleegitamata pruunist paberist käterätikud ribadeks ning need võib seejärel segada mõne sekundiga kultiveerimisveega, et saada väikesed pabersubstraadi tükid. Saadud substraati võib seejärel kohe kasutada *Lumbriculus*'e kultiveerimisakvaariumis, kattes sellega akvaariumi põhja, või säilitada seda hilisemaks kasutamiseks deioniseeritud vees külmutatuna. Üldjuhul jagub uuest substraadist akvaariumis umbes kaheks kuuks.

Iga ussikultuuri loomist alustatakse 500–1 000 ussiga, keda söödetakse perioodiliselt uuendatavas vees või läbivoolurežiimis 3 korda nädalas 10 ml suspensiooniga, mis sisaldab 6 g forelli noorkalade sööta. Staatilises või poolstaatilises kultuuris tuleks bakterite ja seente kasvu ärahoidmiseks söötmissagedust vähendada.

Nendes tingimustes kahekordistub isendite arv kultuuris üldjuhul umbes 10–14 päeva jooksul.

Teise võimalusena võib *Lumbriculus variegatus*'t kultiveerida süsteemis, mis koosneb kunstliku sette valmistamisel kasutatava kvartsliiva kihist (paksus 1–2 cm) ja taastatud veest. Kultiveerimisnõudena võib kasutada 12–20 cm kõrgusi klaasist või roostevabast terasest nõusid. Vett nõudes tuleks kergelt aereerida (nt 2–4 mulli sekundis), kasutades Pasteuri pipetti, mis jääb settepinnast umbes 2 cm kõrgusele. Et hoida ära näiteks ammoniaagi akumuleerumist, tuleks sette kohal oleva vee uuendamiseks kasutada läbivoolusüsteemi või uuendada vett käsitsi vähemalt kord nädalas. Väheharjasusse võib kasvatada toatemperatuuril valgustusperioodiga 16 tundi valgust (valgustustihedus 100–1 000 luksi) ja 8 tundi pimedust. Poolstaatilise kultuuri puhul (vee uuendamine kord nädalas) söödetakse usse kaks korda nädalas söödaga TetraMin (nt 0,6–0,8 mg settepinna cm^2 kohta), mille võib lisada suspensioonina, mis sisaldab 50 mg söödet milliliitri deioniseeritud vee kohta.

Lumbriculus variegatus'e eemaldamiseks kultuurist võib näiteks viia substraadi väikese avaga võrgu abil või ainult organismid leegis töödeldud laia (umbes 5-millimeetrise läbimõõduga) suuga klaaspipeti abil eraldi keeduklaasi. Kui ussid viiakse keeduklaasi koos substraadiga, lastakse usse ja substraati sisaldaval keeduklaasil läbivoolurežiimis öö läbi seista, et kõrvaldada keeduklaasist substraat; ussid jäävad nõu põhja. Seejärel saab ussid viia värske kultiveerimiskeskkonnaga akvaariumidesse või neid katse jaoks täiendavalt töödelda, nagu on kirjeldatud allikates 3 ja 4 ning allpool.

L. variegatus'e kasutamisel settekatsetes on oluline pöörata tähelepanu selle liigi paljunemisviisile (arhitoomia ehk morfallaksis, vt nt allikas 6). Sellise mittesugulise paljunemise tulemusena tekib kaks fragmenti, mis teatava aja jooksul ei toitu, kuni pea- või sabaosa on regenereerunud (nt allikad 7, 8). See tähendab, et *L. variegatus*'e puhul ei ole kokkupuude saastunud sette allaneelamise kaudu pidev.

▼M6

Seepärast tuleks kontrollimatu paljunemise ja regenereerumise minimeerimiseks ja katsetulemuste suure varieeruvuse ärahoidmiseks ussid sünkroonida. Katsetulemused võivad varieeruda, kui isendid, kes on fragmenteerunud ja seepärast teatava perioodi vältel ei toitu, puutuvad uuritava kemikaaliga kokku vähem kui isendid, kes katse vältel ei fragmenteeru (9, 10, 11). Ussid tuleks 10–14 päeva enne kokkupuuteperioodi algust kunstlikult fragmenteerida (sünkroonimine). Sünkroonimiseks tuleks valida suured (täiskasvanud) ussid, kellel soovitatavalt ei esine hiljutise morfallaksise tundemärke. Valitud ussid võib asetada alusklaasile tilka kultiveerimisvette ja need keha keskosast skalpelliga pooleks lõigata. Tuleks jälgida, et tagaosade suurus oleks sarnane. Seejärel tuleks tagaosadel lasta regenereerida uus peaosa kultiveerimisnõudes, mis sisaldavad sama substraati, mida kasutatakse kultuuris ja taastatud vees kuni kokkupuuteperioodi alguseni. Uue peaosa regenereerumisest annab märku sünkroonitud usside kaevumine substraati (peaosa regenereerumises veendumiseks võib vaadelda usside representatiivset osaproovi binokulaarmikroskoobi all). Pärast seda on katseorganismide füsioloogiline seisund eeldatavalt sarnane. See tähendab, et kui katse ajal toimub sünkroonitud usside paljunemine morfallaksise teel, puutuvad praktiliselt kõik loomad rikastatud settega kokku eeldatavalt samal määral. Sünkroonitud usse tuleks sööta ühe korra niipea, kui ussid hakkavad substraati kaevuma, või 7 päeva pärast pooleks lõikamist. Söötmisrežiim peaks olema võrreldav söötmisrežiimiga tavapärases kultuuris, kuid sünkroonitud usside söötmiseks võib olla soovitatav kasutada sama sööta kui katses. Usse tuleks hoida katses kasutataval temperatuuril 20 ± 2 °C. Pärast regenereerumist tuleks katse jaoks valida terved täispikad ussid, kes reageerivad nõrgale mehaanilisele ärritajale aktiivse ujumise või roomamisega. Et hoida ära selliste usside vigastusi või autotoomiat, tuleks nende käsitsemisel kasutada näiteks leegis töödeldud servadega pipette või roostevabast terasest hambaorke.

***Lumbriculus variegatus*'e lähtekultuuride allikad (aadressid USAs pärinevad kirjandusallikast 4)**

Euroopa

ECT Ökotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2–14
D-65439 Flörsheim/Main
Saksamaa

Bayer Crop Science AG
Forschung und Entwicklung – Ökotoxikologie
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Saksamaa

Itä-Suomen yliopisto
Vesistötoksikologian laboratorio
Biologian laitos
Yliopistokatu 7, PL 111
FIN-80101 Joensuu
Soome

Technische Universität Dresden
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Saksamaa

C.N.R.– I.R.S.A.
Consiglio Nationale delle Ricerche
Istituto di Ricerca sulle Acque
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

USA

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

VIITED

(1) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A., ja Mattson, V. R. (1993). Use of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ. Toxicol. Chem*/ 12: 269–279.

(2) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J., ja Kemble, N. E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Con. Tox*. 35: 191–201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. Väljaandes: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) USA Keskkonnakaitseamet (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Teine väljaanne. EPA 600/R-99/064, USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN, märts 2000.

(5) Kukkonen, J., ja Landrum, P. F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem*. 13: 1457–1468.

(6) Drewes, C. D., ja Fourtner, C. R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Dev. Biol*. 138: 94–103.

(7) Leppänen, M. T., ja Kukkonen, J. V. K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem*. 17: 2196–2202.

(8) Leppänen, M. T., ja Kukkonen, J. V. K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183–194.

(9) Brust, K., Licht, O., Hultsch, V., Jungmann, D., ja Nagel, R. (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chem*. 20: 2000–2007.

(10) Oetken, M., Ludwichowski, K.-U., ja Nagel, R. (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-Altstoff-V. Saksamaa Keskkonnaameti (Umweltbundesamt, Berliin) tellimusel; FKZ 360 12 001, märts 2000.

(11) Leppänen, M. T., ja Kukkonen, J. V. K. (1998c). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol*. 32: 1503–1508.

▼**M6**

6. liide

Võrdlusuuringu „sette mürgisuse hindamise katse *Lumbriculus variegatus*'ega"

tulemuste kokkuvõte

Tabel 1.

Võrdlusuuringu raames tehtud eraldi katsete tulemused: usside keskmine arv lahustita ja lahustiga kontrollrühmas katse lõpus; SH = standardhälve; V = variatsioonikordaja.

	Usside keskmine arv lahustita kontrollrühmas	SH	V (%)	n	Usside keskmine arv lahustiga kontrollrühmas	SH	V (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
Laborite-vaheline keskmine	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SH	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
Minimaal-ne	**16,3**				**15,0**			
Maksima-alne	**42,0**				**43,7**			
V (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Tabel 2.

Võrdlusuuringu raames tehtud eraldi katsete tulemused: usside keskmine summaarne kuivmass paralleelproovi kohta lahustita ja lahustiga kontrollrühmas katse lõpus; SH = standardhälve; V = variatsioonikordaja.

	Usside keskmine summaarne kuivmass paralleelproovi kohta lahustita kontrollrühmas	SH	V (%)	n	Usside keskmine summaarne kuivmass paralleelproovi kohta lahustiga kontrollrühmas	SH	V (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Laborite-vaheline keskmine	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SH	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
Minimaal-ne	**12,9**				**10,5**			
Maksima-alne	**41,3**				**41,4**			
V (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tabel 3.

Pentaklorofenooli mürgisus: kokkuvõtlikud andmed võrdlusuuringus kasutatud lõppnäitajate kohta – EC_{50}, NOEC ja LOEC laboritevaheline keskväärtus; NOEC = täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon; LOEC = vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon; SH = standardhälve; V = variatsioonikordaja.

Bioloogiline näitaja		Laboritevaheline keskmine (mg/kg)	Mini-maalne	Maksi-maalne	Laboriteva-heline tegur	SH	V (%)	Geomee-triline keskmine (mg/kg)
Usside üldarv	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	VTE (%)	**22,5**	7,1	39,1				
Usside summaarne kuivmass	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	VTE (%)	**24,8**	10,9	44,7				
Suremus/ elulemus	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
Sigivus (usside arvu suurenemine paralleel-proovi kohta)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6		18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	VTE (%)	**29,7**	13,9	47,9				
Kasv (biomassi suurenemine paralleel-proovi kohta)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	VTE (%)	**32,2**	13,6	65,2				

VTE – väikseim tuvastatav erinevus kontrollväärtusest hüpoteesi kontrollimise ajal; kasutatakse statistilise võimsuse väljendamiseks.

VIIDE

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., ja Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. Koostöös R. Nageli ja B. Karaoglaniga. Aruanne Saksamaa Keskkonnaametile (Umweltbundesamt, Berliin), teadus- ja arendustegevuse projekt nr 202 67 429.

▼M6

C.36. RÖÖVLESTA (*HYPOASPIS* (*GEOLAELAPS*) *ACULEIFER*) SIGIVUSE KATSE MULLAS

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 226 (2008). Katsemeetod on ette nähtud selleks, et hinnata mullas esinevate kemikaalide mõju mullas elavale lestaliigile *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* Canestrini (sugukond *Laelapidae*, alamklass *Acari*) ning teha seeläbi kindlaks populatsiooni kasvu erikiiruse vähenemise hinnanguline määr (1, 2). Sigivuse määra all mõeldakse siin noorloomade arvu katseperioodi lõpus. *H. aculeifer* esindab täiendavat troofilist taset nende liikide kõrval, kelle jaoks katsemeetodid on juba olemas. Leitakse, et käesolev katsemeetod on sigivuskatse jaoks piisav ning paljunemistsükli eri etappide eristamine ja eraldi hindamine ei ole vajalik. Keemiliste ainete puhul, millega kokkupuude toimub muul viisil kui mulla kaudu, võib sobida mõni muu lähenemisviis (3).

2. Lesta *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* peetakse sobivaks mullafauna ja eelkõige röövlestade esindajaks. See liik on ülemaailmse levikuga (5) ning neid lesti saab hõlpsalt koguda ja laboris kasvatada. Ülevaade *H. aculeifer*'i bioloogia kohta on esitatud 7. liites. Taustteave kõnealuse liigi lestade ökoloogia kohta ja nende kasutamise kohta ökotoksikoloogilistes katsetes on kättesaadav allikates 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ja 12.

KATSE PÕHIMÕTE

3. Täiskasvanud emasloomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on eri kontsentratsioonides segatud mullaga. Katset alustatakse 10 täiskasvanud emasloomaga paralleelnõu kohta. Isasloomi katsesse ei kaasata, kuna kogemusest nähtub, et isaste juuresolekul paarituvad emased kohe või veidi aega pärast deutonümfi staadiumile järgnevat koorumist. Peale selle muudaks isaste lisamine katse nii palju pikemaks, et tekiks vajadus keerulise vanuserühmade eristamise järele. Seepärast ei hõlma katse paaritumist. Emasloomadega alustatakse katset 28–35 päeva pärast sünkroonimiseks vajaliku munemisperioodi algust (vt 4. liide), sest siis võib emasloomad lugeda juba paaritunuks ja munemiseelse etapi läbinuks. Kui katse tehakse temperatuuril 20 °C, lõpeb see 14. päeval pärast emasloomade viimist katsenõusse (katse alustamise päev); selle aja jooksul jõuavad esimesed järglased kontrollrühmas deutonümfi staadiumisse (vt 4. liide). Peamise mõõdetava muutujana määratakse noorloomade arv katsenõu kohta ja lisaks määratakse ellujäänud emasloomade arv. Uuritava kemikaaliga kokku puutuvate lestade sigivuse määra võrreldakse vastava näitajaga kontrollrühmas ning olenevalt katseplaanist (vt punkt 29) tehakse kindlaks kas EC_x (nt EC_{10}, EC_{50}) või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (mõisted on määratletud 1. liites). Katse ülevaatlik ajakava on esitatud 8. liites.

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

4. Soovitatavalt peaks olema teada uuritava kemikaali lahustuvus vees, log K_{ow}, jaotuskoefitsient süsteemis muld/vesi ja aururõhk. Samuti on soovitatav lisateabe olemasolu uuritava kemikaali säilivuse kohta mullas, näiteks kemikaali biootilise ja abiootilise lagunemise kiirus.

5. Käesolevat katsemeetodit võib kasutada nii vees lahustuvate kui ka vees lahustumatute kemikaalide puhul. Uuritava kemikaaliga töötlemise viis on neil kahel juhul siiski erinev. Katsemeetodit ei saa kasutada lenduvate kemikaalide puhul, mille Henry konstant või jaotuskoefitsient süsteemis õhk/vesi on suurem kui üks, ega kemikaalide puhul, mille aururõhk 25 °C juures on suurem kui 0,0133 Pa.

▼M6

KATSE NÕUETEKOHASUS

6. Katsetulemus loetakse nõuetekohaseks, kui kemikaaliga mitte kokku puutuvas kontrollrühmas on täidetud järgmised kriteeriumid:

— emasloomade keskmine suremus ei tohiks katse lõpus olla suurem kui 20 %;

— noorloomade keskmine arv paralleelproovi kohta peaks katse lõpuks olema vähemalt 50 (kui katset alustatakse 10 täiskasvanud emasloomaga);

— paralleelnõu kohta saadud noorte lestade keskmise arvu variatsioonikordaja ei tohiks lõpliku katse lõpus olla suurem kui 30 %.

VÕRDLUSKEMIKAAL

7. Tuleb määrata võrdluskemikaali EC_x ja/või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon, et tagada laboris kasutatavate katsetingimuste sobivus ja veenduda, et katseorganismide reaktsioon ei ole aja jooksul muutunud. Sobiv võrdluskemikaal on dimetoaat (CASi nr 60-51-5), mille mõju populatsiooni arvukusele on tõendatud (4). Teise võimaliku võrdluskemikaalina võib kasutada boorhapet (CASi nr 10043-35-3). Viimati nimetatud kemikaaliga on vähem kogemusi. On võimalik kasutada kahte lähenemisviisi.

— Võrdluskemikaali võib hinnata samaaegselt iga uuritava kemikaali mürgisuse määramisega, kasutades ühte kontsentratsiooni, mille puhul on kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse uuringuga eelnevalt tõendatud, et järglaste arv väheneb > 50 % võrra. Sellisel juhul peaks paralleelproovide arv olema sama kui kontrollrühmas (vt punkt 29).

— Teise võimalusena tehakse katse võrdluskemikaaliga 1–2 korda aastas kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse katsena. Olenevalt valitud lähenemisviisist on kontsentratsioonide ja paralleelproovide arv ning kontsentratsioonide jada tegur erinevad (vt punkt 29), ent saavutatava mõju määr peaks jääma vahemikku 10–90 % (jada tegur 1,8). Noorloomade arvu põhjal leitav EC_{50} peaks dimetoaadi puhul jääma vahemikku 3,0–7,0 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Boorhappe puhul peaks noorloomade arvu põhjal leitav EC_{50} jääma praeguseks saadud andmete kohaselt vahemikku 100–500 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Katsenõud ja seadmed

8. Tuleks kasutada klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist ja tihedalt sulguva kaanega katsenõusid läbimõõduga 3–5 cm (mullakihi paksus ≥ 1,5 cm). Eelistatakse keeratava kaanega nõusid ning sel juhul tuleks neid aereerida kaks korda nädalas. Teise võimalusena võib kasutada katet, mis võimaldab otsest gaasivahetust substraadi ja atmosfääri vahel (nt marli). Kuna niiskusesisaldus peab katse vältel olema piisavalt suur, on väga oluline kontrollida katse kestel iga katsenõu kaalu ja vajaduse korral vett juurde lisada. See võib olla eriti oluline juhul, kui ei kasutata keeratavaid kaasi. Läbipaistmatu katsenõu kasutamise korral peaks kaas olema valguse juurdepääsu võimaldavast materjalist (nt läbipaistev augustatud kaas), kuid samal ajal takistama lestade põgenemist. Katsenõu suurus ja tüüp sõltuvad ekstraheerimismeetodist (üksikasjalik kirjeldus on esitatud 5. liites). Kui kuumusega ekstraheerimine viiakse läbi otse katsenõus, võib lisada sobiva suurusega avadega põhjavõrgu (kuni ekstraheerimiseni kinni kaetud) ning mulla sügavus peaks olema temperatuuri ja niiskuse gradiendi tekkimiseks piisav.

▼M6

9. On vaja tavapäraseid laboriseadmeid, täpsemalt järgmist:

— soovitatavalt klaasnõud keeratava kaanega;

— kuivatuskapp;

— stereomikroskoop;

— harjad lestade teisaldamiseks;

— pH-meeter ja fotomeeter;

— sobiv täpne kaal;

— sobivad temperatuuri reguleerimise seadmed;

— sobivad õhuniiskuse reguleerimise seadmed (ei ole hädavajalikud, kui kokkupuutenõu on kaanega);

— reguleeritava temperatuuriga inkubaator või väike ruum;

— ekstraheerimisseadmed (vt 5. liide) (13);

— reguleeritava ülaltvalgustusega valguspaneel;

— purgid ekstraheeritud lestade kogumiseks.

Kunstliku mulla valmistamine

10. Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse kunstlikku mulda. See koosneb järgmistest koostisosadest (kõik väärtused põhinevad kuivmassil):

— 5 % turbasamblaturvast, mis on õhu käes kuivatatud ja peeneks jahvatatud (lubatav osakeste suurus on 2 ± 1 mm);

— 20 % kaoliinsavi (soovitatav kaoliniidisisaldus üle 30 %);

— umbes 74 % tööstuslikku liiva (sõltuvalt vajalikust $CaCO_3$ kogusest), mis on õhu käes kuivatatud ja koosneb peamiselt peenest liivast, millest üle 50 % moodustavad osakesed suurusega 50–200 mikromeetrit. Liiva täpne kogus sõltub $CaCO_3$ kogusest (vt allpool): nende koostisosade summaarne osakaal peaks olema 75 %;

— < 1,0 % kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$, pulbristatud, analüütilise puhtusastmega), et saavutada pH väärtus 6,0 ± 0,5; lisatava kaltsiumkarbonaadi kogus võib sõltuda eelkõige turba kvaliteedist ja omadustest (vt märkus 1).

*Märkus 1:*vajalik $CaCO_3$ kogus sõltub mullasubstraadi koostisosadest ja tuleks mulla osaproovide pH mõõtmise teel kindlaks teha vahetult enne katset (14).

Märkus 2: kunstliku mulla turbasisaldus erineb mullaorganismide puhul kasutatavate muude katsemeetoditega ette nähtud turbasisaldusest, mis on enamikul juhtudel 10 % (nt allikas 15). Euroopa Taimekaitseorganisatsiooni (EPPO) andmetel (16) ei sisalda tüüpiline põllumajanduslik muld siiski üle 5 % orgaanilist ainet ning seega peegeldab väiksem turbasisaldus loodusliku mulla väiksemat võimet tagada uuritava kemikaali sorbeerumine orgaanilisele süsinikule.

Märkus 3: vajaduse korral, näiteks katse konkreetsete eesmärkide saavutamiseks võib katse- ja/või kultiveerimissubstraadina kasutada ka saastevabast allikast pärit looduslikku mulda. Loodusliku mulla kasutamisel tuleks esitada vähemalt selle päritolu (kogumiskoht), pH, lõimis (osakeste suurusjaotus) ja orgaanilise aine sisaldus. Võimaluse korral tuleks lisada ka mulla tüüp ja

▼M6

nimetus vastavalt mulla klassifitseerimissüsteemile ning selline muld peaks olema saastevaba. Kui uuritav kemikaal on metall või metallorgaaniline ühend, tuleks määrata ka loodusliku mulla katioonivahetusmahtuvus. Nõuetekohasuse kriteeriumide täitmisele tuleks pöörata erilist tähelepanu, kuna üldjuhul on taustteave loodusliku mulla kohta harva kättesaadav.

11. Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (nt suure mahutavusega laborisegistis). Mulla pH mõõtmiseks kasutatakse mulla ja 1 M kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M kaltsiumkloriidi ($CaCl_2$) lahuse segu suhtega 1:5 (vt allikas 14 ja 3. liide). Kui mulla happesus on suurem kui nõutavasse vahemikku jäävad väärtused (vt punkt 10), võib selle reguleerimiseks lisada sobiva koguse $CaCO_3$. Kui muld on liiga leeliseline, võib happesuse suurendamiseks lisada punktis 10 kirjeldatud esimesest kolmest koostisosast koosnevat segu, millest on välja jäetud $CaCO_3$.

12. Kunstliku mulla maksimaalne veemahutavus määratakse vastavalt 2. liites kirjeldatud meetodile. Kaks kuni seitse päeva enne katse alustamist eelniisutatakse kuiva kunstlikku mulda piisava koguse destilleeritud või deioniseeritud vee lisamise teel, et saavutada veesisaldus, mis on umbes poole väiksem kui lõplik veesisaldus, mis jääb vahemikku 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest. Niiskusesisaldus viiakse 40–60 protsendini maksimaalsest veemahutavusest, lisades uuritava kemikaali lahust ja/või destilleeritud või deioniseeritud vett (vt punktid 16–18). Mulla niiskusesisalduse täiendavaks ligikaudseks kontrollimiseks tuleks mulda õrnalt peos pigistada: sobiva niiskusesisalduse korral peaksid sõrmede vahele ilmuma väikesed veetilgad.

13. Mulla niiskusesisaldus määratakse katse alguses ja lõpus vastavalt standardile ISO 11465 (17), kuivatades mulda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu, ning mulla pH määratakse vastavalt 3. liitele või standardile ISO 10390 (14). Nende mõõtmiste tegemiseks tuleks kasutada lestadeta lisaproove nii kontrollmullast kui ka igale katsekontsentratsioonile vastavast mullast. Kui katses kasutatakse happelist või aluselist kemikaali, ei tohiks mulla pH-d muuta. Niiskusesisaldust tuleks jälgida kogu katse vältel, kaaludes nõusid korrapäraselt (vt punktid 20 ja 24).

Katseloomade valimine ja ettevalmistamine

14. Katses kasutatav liik on *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* (Canestrini, 1883). Katse alustamiseks on vaja sünkroonitud kultuurist pärit täiskasvanud emaseid lesti. Lestadega alustatakse katset umbes 7–14 päeva pärast nende täiskasvanuks saamist ehk 28–35 päeva pärast sünkroonimiseks vajaliku munemisperioodi algust (vt punkt 3 ja 4. liide). Tuleks registreerida lestade päritolu või tarnija ja laborikultuuri säilitamise andmed. Laborikultuuri säilitamise korral soovitatakse viia liigi kinnitav määramine läbi vähemalt kord aastas. Määramiseks kasutatav vorm on esitatud 6. liites.

Katsekontsentratsiooniga segude valmistamine

15. Uuritav kemikaal segatakse mulla sisse. Orgaanilised lahustid, mis hõlbustavad mulla töötlemist uuritava kemikaaliga, tuleks valida lähtuvalt nende vähesest mürgisusest lestadele ning katseplaani tuleb lisada asjakohane lahustiga kontroll (vt punkt 29).

Vees lahustuv uuritav kemikaal

16. Uuritava kemikaali lahus valmistatakse deioniseeritud vees sellises koguses, millest piisab kõikidele ühe katsekontsentratsiooni puhul kasutatavatele paralleelkultuuridele. Soovitatakse kasutada sobivas koguses vett, et saavutada nõutav niiskusesisaldus, st 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest (vt punkt 12). Enne katsenõusse viimist segatakse uuritava kemikaali iga lahus põhjalikult ühe partii eelniisutatud mullaga.

▼M6

Vees lahustumatu uuritav kemikaal

17. Vees lahustumatu, kuid orgaanilises lahustis lahustuva kemikaali võib lahustada võimalikult väikeses koguses sobivas kandeaines (nt atsetoonis). Tuleks kasutada üksnes lenduvaid lahusteid. Kandeaine kasutamisel tuleks kõikide katsekontsentratsioonide ja kontrollrühma puhul kasutada kandeaine sama miinimumkogust. Kandeaine pihustatakse väikesele kogusele, näiteks 10 grammile peenele kvartsliivale või segatakse sellega. Substraadi liivasisaldust tuleks selle koguse võrra muuta. Kandeaine kõrvaldatakse vähemalt üks tund kestva tõmbekapis aurustamise teel. Kvartsliiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelniisutatud mullale ja pärast nõutava niiskusesisalduse saavutamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist segatakse saadav segu põhjalikult läbi. Lõplik segu viiakse katsenõudesse. Tuleb arvestada, et mõni lahusti võib olla lestadele mürgine. Seepärast on juhul, kui lahusti mürgisus lestadele ei ole teada, soovitatav kasutada täiendavat veega kontrolli, mis ei sisalda lahustit. Kui on veenvalt tõendatud, et lahusti ei avalda (kasutatavatel kontsentratsioonidel) mingit mõju, võib veega kontrolli ära jätta.

Vees ja orgaanilistes lahustites raskesti lahustuv uuritav kemikaal

18. Vees ja orgaanilistes lahustites raskesti lahustuva kemikaali puhul segatakse soovitava katsekontsentratsiooni saavutamiseks vajalik kogus uuritavat kemikaali sellise koguse peeneks jahvatatud kvartsliivaga, mis vastab 2,5 grammile katsenõu kohta (nt 10 g peent kvartsliiva nelja paralleelnõu kohta). Substraadi liivasisaldust tuleks selle koguse võrra muuta. Kõnealune kvartsliiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelniisutatud mullale ja pärast nõutava niiskusesisalduse saavutamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist segatakse saadav segu põhjalikult läbi. Lõplik segu jaotatakse katsenõudesse. Kirjeldatud toiminguid korratakse iga katsekontsentratsiooni puhul ning valmistatakse ka sobiv kontrollsegu.

KATSE KÄIK

Katse- ja kontrollrühmad

19. Iga kontroll- ja katsenõu puhul soovitatakse lisada 10 täiskasvanud emaslooma kunstlikusse mulda kuivmassiga 20 g. Katseorganismid tuleks lisada kahe tunni jooksul pärast lõpliku katsesubstraadi valmistamist (st pärast uuritava kemikaali lisamist). Erijuhul (nt kui vanandamist peetakse määravaks teguriks) võib lõpliku katsesubstraadi valmistamisest lestade lisamiseni jäävat ajavahemikku pikendada (sellist vanandamist käsitletakse üksikasjalikult allikas 18). Sellisel juhul tuleb aga esitada asjakohane teaduslik põhjendus.

20. Pärast lestade lisamist mullale lisatakse lestade sööt ja seejärel tuleks määrata iga katsenõu algkaal, et kasutada seda võrdlusalusena mulla niiskusesisalduse jälgimiseks katse vältel vastavalt punktis 24 kirjeldatule. Seejärel kaetakse katsenõud punktis 8 kirjeldatud viisil ja paigutatakse katsekambrisse.

21. Iga punktides 15–18 kirjeldatud meetodi puhul, mida kasutatakse uuritava kemikaaliga töötlemiseks, valmistatakse ka asjakohased kontrollkultuurid. Selleks järgitakse asjaomast kirjeldatud meetodit, ent ainsa erinevusena jäetakse uuritav kemikaal lisamata. Seega töödeldakse kontrollkultuure vajaduse korral orgaanilise lahusti, kvartsliiva või muu kandeainega, kasutades sama kontsentratsiooni või koguselist määra kui uuritava kemikaaliga kultuuride puhul. Kui uuritava kemikaali lisamiseks kasutatakse lahustit või muud kandeainet ja selle mürgisus ei ole teada, tuleks katses kasutada veel ühte kandeaineta ja uuritava kemikaalita kontrolli (vt punkt 17).

▼M6

Katsetingimused

22. Katsetemperatuur peaks olema 20 ± 2 °C. Temperatuur tuleks registreerida vähemalt kord päevas ja vajaduse korral tuleks seda reguleerida. Katses kasutatakse kontrollitavat valgustusrežiimi (soovitatavalt 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust) ja katsenõude läheduses valgustustihedust 400–800 luksi. Võrdlemise võimaldamiseks on need tingimused samad kui muude ökotoksikoloogiliste mullakatsete puhul (nt allikas 15).

23. Kui kasutatakse keeratavaid kaasi, tuleks gaasivahetuse tagamiseks aereerida katsenõusid vähemalt kaks korda nädalas. Kui kasutatakse marlikatet, tuleks pöörata erilist tähelepanu mulla niiskusesisalduse säilitamisele (vt punktid 8 ja 24).

24. Katsenõus oleva mullasubstraadi veesisaldus hoitakse kogu katse vältel konstantsena; selleks kaalutakse nõusid korrapäraselt (nt kord nädalas) ja lisatakse vajaduse korral vett juurde. Võimaliku veekao korvamiseks lisatakse deioniseeritud vett. Niiskusesisaldus ei tohiks katse kestel erineda algväärtusest rohkem kui 10 %.

Söötmine

25. On leitud, et söödaks sobib juustulest (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)). Samuti võivad söödaks sobida väikesed hooghännalised (nt noorloomad liigist *Folsomia candida* Willem, 1902 või *Onychiurus fimatus*) (19, 20), valgeliimuklased (nt *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992)) ja ümarussid (nt *Turbatrix silusiae* de Man, 1913) (21). Sööta soovitatakse enne katses kasutamist kontrollida. Sööda liik ja kogus peaksid olema sellised, millega saadakse nõuetekohasuse kriteeriumide täitmiseks piisav arv noorloomi (punkt 6). Saaklooma valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali toimemehhanismi (nt akaritsiid võib olla mürgine ka söödaks kasutatavatele lestadele; vt punkt 26).

26. Sööt peaks olema kättesaadav *ad libitum* (st iga kord lisatakse väike kogus (spaatliotsatäis)). Selleks otstarbeks võib kasutada ka hooghännalisi käsitlevas katsemeetodis kirjeldatud väikese võimsusega imurit või väikest värvipintslit. Tavaliselt piisab, kui lisada sööta katse alguses ja seejärel kaks kuni kolm korda nädalas. Kui ilmneb, et uuritav kemikaal on saakloomale mürgine, tuleks kaaluda söötmissageduse suurendamist ja/või muu sööda kasutamist.

Katsekontsentratsioonide valimine

27. Sobivate katsekontsentratsioonide valimisel on kasu varasemast teabest uuritava kemikaali mürgisuse kohta, näiteks kontsentratsioonivahemiku leidmise katse tulemustest. Vajaduse korral tehakse kontsentratsioonivahemiku leidmise katse, kasutades viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni vahemikus 0,1–1 000 mg kuiva mulla kilogrammi kohta ning iga kontsentratsiooni ja kontrolli puhul vähemalt ühte paralleelproovi. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kestus on 14 päeva; seejärel määratakse täiskasvanud lestade suremus ja noorloomade arv. Lõplikus katses tuleks kontsentratsioonivahemik soovitatavalt valida nii, et see hõlmaks kontsentratsioone, mille juures täheldatakse mõju noorloomade arvule, kuid mitte täiskasvanud emasloomade elulemusele. Kemikaalide puhul, mis avaldavad surmavat ja subletaalset mõju peaaegu samal kontsentratsioonil, ei pruugi see siiski võimalik olla. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x (nt EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) väärtust ja kontsentratsioonivahemikku, mille puhul uuritav kemikaal avaldab huvipakkuvat mõju. Ekstrapoleerimist väärtuseni, mis on oluliselt väiksem kui väikseim kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse mõju katseorganismidele, või suurem kui suurim katses kasutatav kontsentratsioon, tuleks kasutada üksnes erandjuhul ja selle kohta tuleks katseprotokollis esitada ammendav selgitus.

Katseplaan

Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse katse

28. Ühe muu võrdlusuuringu (valgeliimuklaste sigivuse katse (22)) alusel välja töötatud soovitustest lähtuvalt pakutakse välja kolm katseplaani. *H. aculeifer*'iga

▼M6

tehtud valideerimise tulemused kinnitavad kõikide kõnealuste katseplaanide üldist sobivust.

29. Kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramisel tuleks meeles pidada järgmist.

— EC_x (nt EC_{10}, EC_{50}) määramiseks tuleks katses kasutada kahtteist kontsentratsiooni. Soovitatakse kasutada vähemalt kahte paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja kuut paralleelnõu kontrollrühmas. Kontsentratsioonide jada tegur võib varieeruda, st olla eeldatavas mõju avaldumise vahemikus 1,8 või väiksem ning sellest vahemikust väljaspool olevate suuremate ja väiksemate kontsentratsioonide puhul üle 1,8.

— Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramiseks tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 2,0.

— Kombineeritud lähenemisviis võimaldab määrata nii täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni kui ka EC_x. Tuleks kasutada kaheksat uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 1,8.

Piirsisalduskatse

30. Kui kontsentratsioonivahemiku leidmise katses ei täheldata suurimal kasutatud kontsentratsioonil (nt kontsentratsioonil 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta) mingit mõju, võib lõpliku sigivuskatse teha piirsisalduskatsena, kasutades kontsentratsiooni 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Piirsisalduskatse võimaldab tõendada, et täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon või EC_{10} on sigivuse puhul suurem kui kõnealune piirkontsentratsioon, ning samal ajal minimeerida katses kasutatavate lestade arvu. Nii uuritava kemikaaliga mulla kui ka kontrollmulla puhul tuleks kasutada kaheksat paralleelnõu.

Katse kestus ja mõõtmised

31. Kõik täheldatud erinevused uuritava kemikaaliga nõudes ja kontrollnõudes olevate lestade käitumises ja morfoloogias tuleks registreerida.

32. Ellujäänud lestad eemaldatakse mullast 14. katsepäeval kuumusega/valgusega ekstraheerimise teel või muu sobiva meetodiga (vt 5. liide). Noorloomad (st vastsed, protonümfid ja deutonümfid) ja täiskasvanud loomad loendatakse eraldi. Ekstraheerimise käigus leidmata jäänud täiskasvanud lestad registreeritakse surnud lestadena, kuna eeldatavalt surid nad ja lagundati enne hindamist. Ekstraheerimise tõhusust tuleb kontrollida kord või kaks aastas, kasutades kontrollrühma, milles täiskasvanud ja noorloomade arv on teada. Ekstraheerimise keskmine tõhusus peaks kõiki arenguetappe hõlmavate koondtulemuste puhul olema üle 90 % (vt 5. liide). Täiskasvanud ja noorloomade arvu ei korrigeerita ekstraheerimise tõhususe suhtes.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

33. Teave statistiliste meetodite kohta, mida võib kasutada katsetulemuste analüüsimiseks, on esitatud punktides 36–41. Peale selle tuleks tutvuda OECD dokumendiga nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" („Praegused meetodid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks: rakendamissuunised") (31).

34. Katse peamine lõppnäitaja on sigivus, mida siin väljendatakse katsenõu kohta saadud noorloomade arvuna (alustades katset 10 täiskasvanud emasloomaga). Statistilise analüüsi käigus tuleb arvutada sigivuse määra aritmeetiline keskmine (X) ja hajuvus (s^2) uuritava kemikaaliga rühmades ja kontroll-

▼M6

rühmas.
Näitajaid X ja s^2 kasutatakse selliste dispersioonanalüüsi meetodite puhul nagu Studenti t-test, Dunnetti test või Williamsi test, samuti usaldusvahemiku leidmiseks usaldusnivool 95 %.

Märkus: kõnealune peamine lõppnäitaja on samaväärne sigivuse määraga, mida väljendatakse katses saadud elus noorloomade arvu ja katse alguses lisatud täiskasvanud emasloomade arvu jagatisena.

35. Ellujäänud emasloomade arv kemikaalita kontrollrühmas on üks oluline nõuetekohasuse kriteerium ja see tuleb registreerida. Sarnaselt kontsentratsioonivahemiku leidmise katsele tuleks lõpp-protokolli märkida ka kõik muud kahjuliku mõju ilmingud.

EC_x

36. Punktis 34 kirjeldatud näitajat iseloomustavad EC_x väärtused ning nende alumised ja ülemised usalduspiirid usaldusnivool 95 % arvutatakse asjakohaste statistiliste meetoditega (nt probitanalüüs, logistiline või Weibulli funktsioon, kohandatud Spearmani-Kärberi meetod või lihtne interpoleerimine). EC_x leidmiseks sisestatakse kasutatavasse võrrandisse kontrollproovide keskväärtusest x % moodustav väärtus. EC_{50} või mõne muu EC_x arvutamiseks tuleks kasutatud kontsentratsioonidele vastavate keskmiste (X) suhtes kohaldada regressioonanalüüsi.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon

37. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha kindlaks täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon või vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon, on vaja statistilisi andmeid iga nõu kohta (eraldi nõusid käsitletakse paralleelproovidena). Tuleks kasutada asjakohaseid statistilisi meetodeid kooskõlas OECD dokumendiga nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”. Uuritava kemikaali pärssiva mõju hindamiseks kontrollrühmaga võrreldes kasutatakse üldjuhul hüpoteesi ühepoolset (väiksemamahulist) kontrollimist p väärtusel $\leq 0{,}05$. Sellekohased näited on esitatud järgnevates punktides.

38. Andmete normaaljaotust saab kontrollida näiteks andmete mudeliga sobivuse hindamiseks kasutatava Kolmogorovi-Smirnovi testi, variatsiooniulatuse ja standardhälbe suhtel põhineva testi või Shapiro-Wilki testiga (kahepoolne, $p \leq 0{,}05$). Hajuvuse homogeensuse kontrollimiseks võib kasutada Cochrani, Levene'i või Bartletti testi (kahepoolne, $p \leq 0{,}05$). Kui parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, hajuvuse homogeensus) on täidetud, võib kasutada ühepoolset dispersioonanalüüsi (ANOVA) ja järgnevaid mitmese võrdluse teste. Et teha kindlaks, kas kontrollrühm ja uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidele vastavad katserühmad on üksteisest oluliselt erinevad ($p \leq 0{,}05$), võib kasutada mitmese võrdluse testi (nt Dunnetti t-testi) või muutujate sammuviisilise elimineerimisega trenditesti (kontsentratsiooni ja mõju vahelise monotoonse sõltuvuse korral nt Williamsi testi) (soovitatava testi valimisel lähtutakse OECD dokumendist nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”). Et määrata LOEC ja NOEC, tuleks kasutada mitteparameetrilist meetodit (nt Bonferroni U-testi vastavalt Holmile või Jonckheere'i-Terpstra trenditesti).

Piirsisalduskatse

39. Kui on tehtud piirsisalduskatse (kontrollrühma võrdlemine ainult ühele kontsentratsioonile vastava katserühmaga) ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeensus) on täidetud, võib arvulise tunnuse analüüsimiseks kasutada Studenti t-testi. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testi (Welchi t-test) või mitteparameetrilist testi, näiteks Manni-Whitney U-testi.

40. Kontrollrühmade (lahustita ja lahustiga kontrollproovide) vaheliste oluliste erinevuste kindlakstegemiseks võib kummagi kontrollrühma paralleelproove analüüsida piirsisalduskatse puhul kirjeldatud viisil. Kui kõnealuste testi-

▼M6

dega
ei tuvastata olulisi erinevusi, võib kõikide lahustita ja lahustiga kontrollproovide andmed ühte koondada. Vastasel juhul tuleks kõikide katserühmade andmeid võrrelda lahustiga kontrollproovide andmetega.

Katseprotokoll

41. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

— *Uuritav kemikaal:*

— uuritava kemikaali identifitseerimisandmed, nimetus, partii, CASi number, puhtus;

— uuritava kemikaali füüsikalis-keemilised omadused (nt log K_{ow}, vees lahustuvus, aururõhk, Henry konstant (H) ja soovitatavalt teave kemikaali säilivuse kohta mullas).

— *Katseorganismid:*

— katseorganismide identifitseerimisandmed ja tarnija, kultiveerimistingimuste kirjeldus;

— katseorganismide vanusevahemik.

— *Katsetingimused:*

— katseplaani ja katse läbiviimise kirjeldus;

— katsemulla valmistamise üksikasjad; loodusliku mulla kasutamise korral mulla üksikasjalikud andmed (päritolu, taust, osakeste suurusjaotus, pH, orgaanilise aine sisaldus ja võimaluse korral mulla klassifitseerimisandmed);

— mulla maksimaalne veemahutavus;

— selle meetodi kirjeldus, mida kasutati mulla töötlemiseks uuritava kemikaaliga;

— üksikasjad abikemikaalide kohta, mida kasutati uuritava kemikaaliga töötlemiseks;

— katsenõude suurus ja katsemulla kuivmass nõu kohta;

— katsetingimused: valgustustihedus, valgus- ja pimedusperioodi kestus, temperatuur;

— söötmisrežiimi kirjeldus, katses kasutatud sööda liik ja kogus, söötmiskuupäevad;

— mulla pH ja veesisaldus katse alguses ja kestel (kontrollrühmas ja igas uuritava kemikaaliga rühmas);

— ekstraheerimismeetodi üksikasjalik kirjeldus ja ekstraheerimise tõhusus.

— *Katsetulemused:*

— noorloomade arv igas katsenõus katse lõpus;

— täiskasvanud emasloomade arv ja täiskasvanud loomade suremus (%) igas katsenõus katse lõpus;

— ilmsete sümptomite ja selgete käitumuslike muutuste kirjeldus;

— võrdluskemikaaliga saadud tulemused;

— kokkuvõtlikud näitajad (EC_x ja/või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) koos usalduspiiridega usaldusnivool 95 % ning nende arvutamise meetodi kirjeldus;

▼M6

— kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;

— kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse ajal täheldatud ebatavalised ilmingud.

KIRJANDUS

(1) Casanueva, M. E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool*. 57: 21–46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pac. Insects* 24: 259–274.

(3) Bakker, F. M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E. D., ja van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *J. Soils Sediments* 3: 73–77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2. väljaanne. Väljaandes: Dahl, F. (toim.), Die Tierwelt Deutschlands, 59. Teil. G. Fischer, Jena, 523 lk.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males? Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). Väljaandes: Dusbabek, F., ja Bukva, V. (toim.), Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, Haag. 1. köide, lk 487–492.

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC, lk 241–249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio, lk 621–628.

(8) Krogh, P. H., ja Axelsen, J. A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. Väljaandes: Løkke, H., ja van Gestel, C. A. M., Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, lk 239–251.

(9) Løkke, H., Janssen, C. R., Lanno, R. P., Römbke, J., Rundgren, S., ja Van Straalen, N. M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. Väljaandes: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P. W., Van Straalen, N. M., ja Tarazona, J. V. (toim.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 lk.

(10) Schlosser, H.-J., ja Riepert, F. (1992a). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. *Zool. Beitr*. N. F. 34: 395–412.

(11) Schlosser, H.-J., ja Riepert, F. (1992b). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr*. N. F. 34: 413–433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K., ja Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). *Environ. Sci. Technol*. 39: 7154–7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, lk 95–122.

(14) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

▼**M6**

(15) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.

(16) EPPO (2003). EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP / EPPO Bull. 33, lk 195–209.

(17) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P. W., Van Straalen, N. M., ja Tarazona, J. V. (2002). Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. (1981). Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol*. 3: 122–125.

(20) Schlosser, H.-J., ja Riepert, F. (1992c). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). *Zool. Beitr*. N. F. 34: 395–433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M., ja Krogh, P. H. (2007). Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. *Appl. Soil Ecol*. 36: 130–135.

(22) Käesoleva lisa peatükk C.32 „Valgeliimuklaste sigivuse katse”.

(23) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

(24) Southwood, T. R. E. (1991). Ecological methods: With particular reference to the study of insect populations. (2. väljaanne.) Chapman & Hall, London, 524 lk.

(25) Dunger, W., ja Fiedler, H. J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. (2. väljaanne.) G. Fischer, Jena, 539 lk.

(26) Lesna, I., ja Sabelis, M. W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes” in a soil predatory mite. *Nature* 401: 581–583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol*. 7: 103–107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). *Zool. Pol*. 24: 11–59.

(30) Kevan, D. K. McE., ja Sharma, G. D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). *Acarologia* 6: 647–658.

(31) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 54, ENV/JM/-MONO(2006)18.

▼M6

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid (kõiki kontsentratsioone, mille puhul mõju avaldub teatud kindlal määral, väljendatakse uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta).

Kemikaal – aine või segu.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) – uuritava kemikaali väikseim kontsentratsioon, mille juures täheldatakse teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul toime on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC_{50} on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M6

2. liide

Mulla maksimaalse veemahutavuse määramine

Mulla maksimaalse veemahutavuse määramiseks peetakse sobivaks järgmist meetodit. Seda kirjeldatakse standardi ISO/DIS 11268-2 („Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction") (23) C lisas.

Sobiva proovivõtuseadme (puuriga toru vmt) abil kogutakse kindlaksmääratud kogus (nt 5 g) katsemulda. Toru alumine ots kaetakse filterpaberi tükiga, toru täidetakse veega ja pannakse resti peale veevanni. Toru tuleks vette lasta vähehaaval, kuni veetase on mullapinnast kõrgemal. Seejärel tuleks toru umbes kolmeks tunniks vette jätta. Kuna muld ei suuda hoida kogu kapillaaridesse absorbeerunud vett, tuleks mullaproovil lasta kahe tunni vältel nõrguda, asetades toru väga märja peeneks jahvatatud kvartsliiva kihile, mis paikneb kuivamise ärahoidmiseks suletud nõus. Seejärel tuleks proov kaaluda ning kuivatada seda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu. Veemahutavuse saab seejärel arvutada järgmise valemiga:

$$\text{Veemahutavus (protsentides kuivmassist)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100,$$

kus:

S on veega küllastunud substraadi mass + toru mass + filterpaberi mass;

T on tühimass (toru mass + filterpaberi mass);

D on substraadi kuivmass.

▼**M6**

3. liide

Mulla pH määramine

Allpool kirjeldatud meetod mulla pH määramiseks põhineb kirjeldusel, mis on esitatud standardis ISO/DIS 10390 „Soil Quality – Determination of pH” (16).

Kindlaksmääratud mullakogusel lastakse toatemperatuuril vähemalt 12 tundi kuivada. Seejärel valmistatakse vähemalt 5 grammi mulda sisaldav suspensioon, kasutades 1 M analüütilise puhtusastmega kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M analüütilise puhtusastmega kaltsiumkloriidi ($CaCl_2$) lahust, mille maht on mulla mahust viis korda suurem. Suspensiooni loksutatakse põhjalikult viis minutit ja seejärel lastakse sellel settida vähemalt kaks tundi, kuid mitte kauem kui 24 tundi. Seejärel mõõdetakse vedela faasi pH väärtus pH-meetriga, mis kaliibritakse enne iga mõõtmist sobiva rea puhverlahustega (nt pH väärtustel 4,0 ja 7,0).

▼M6

4. liide

Hypoaspis (_Geolaelaps_) _aculeifer_'i ja söödaks kasutatavate lestade kasvatamine ning kultuuri sünkroonimine

Hypoaspis (_Geolaelaps_) _aculeifer_'i kasvatamine

Kultuure võib säilitada plastnõudes või klaaspurkides, mis on täidetud kipsi ja söepulbri seguga (9:1). Kipsi niiskena hoidmiseks võib vajaduse korral lisada mõne tilga destilleeritud või deioniseeritud vett. Optimaalne kasvatustemperatuur on 20 ± 2 °C; valgus- ja pimedusperioodi pikkus ei ole selle liigi puhul oluline. Saakloomana võib kasutada lesti liigist *Typrophagus putrescentiae* või *Caloglyphus* sp. (söödaks kasutatavate lestade käsitsemisel tuleb olla ettevaatlik, kuna need võivad inimesel allergiat põhjustada), ent sobivad ka ümarussid, valgeliimuklased ja hooghännalised. Saaklooma päritolu tuleks registreerida. Populatsioon võib tekkida ühestainsast emasloomast, sest isasloomad arenevad viljastamata munarakkudest. Põlvkonnad eksisteerivad suures osas samaaegselt. Emaslooma eluiga võib ulatuda vähemalt 100 päevani ja ta võib muneda elu jooksul umbes 100 muna. Maksimaalne munemissagedus saavutatakse 10–40 päeva pärast täiskasvanuks saamist ja see on 2,2 muna emaslooma kohta päevas. Aeg munast täiskasvanud emaslooma väljaarenemiseni on 20 °C juures umbes 20 päeva. Eelnevalt tuleks säilitada ja kasvatada enam kui ühte kultuuri.

***Typrophagus putrescentiae* kasvatamine**

Lesti hoitakse klaasnõus, mis on täidetud peene õllepärmipulbriga ja mis paigutatakse põgenemise ärahoidmiseks KNO_3 lahusega täidetud plastämbrisse. Söödaks kasutatavad lestad pannakse selle pulbri pinnale. Seejärel segatakse need spaatli abil ettevaatlikult pulbriga (mida tuleb vahetada kaks korda nädalas).

Kultuuri sünkroonimine

Katses kasutatavad isendid peaksid olema umbes ühevanused (täiskasvanuks saamisest peaks olema möödunud umbes 7 päeva). Kasvatustemperatuuril 20 °C on see saavutatav järgmiselt:

emasloomad viiakse puhtasse kasvatusnõusse ja lisatakse piisavas koguses sööta;

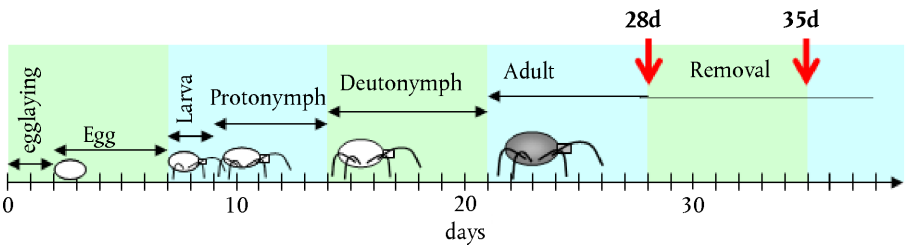
— loomadel lastakse kaks kuni kolm päeva muneda ja seejärel emasloomad eemaldatakse;

— 28–35 päeva pärast täiskasvanud emasloomade viimist puhtasse kasvatusnõusse võetakse nõust täiskasvanud emasloomad katse tegemiseks.

Täiskasvanud emasloomi saab muus arenguetapis olevaist loomadest ja isasloomadest hõlpsalt eristada nende suuremate mõõtmete, paisunud kehakuju (isasloomad on peenemad ja lamedad) ja seljakilbi pruuni värvuse järgi: ebaküpsete lestade värvus varieerub valgest kreemikani. Lestade areng temperatuuril 20 °C toimub üldjoontes vastavalt allpool kirjeldatud skeemile (joonis): munastaadium 5 päeva, vastsestaadium 2 päeva, protonümfi staadium 5 päeva, deutonümfi staadium 7 päeva, emaslooma munemiseelne periood 2 päeva. Seejärel on lestad täiskasvanud.

Joonis.

Hypoaspis (_Geolaelaps_) _aculeifer_'i areng temperatuuril 20 °C. („Eemaldamine” – katses kasutatavate emasloomade eemaldamine.)



▼**M6**

Täiskasvanud katseloomad eemaldatakse sünkroonitud kultuurist ja viiakse katsenõudesse 28–35 päeva pärast seda, kui eelmise põlvkonna emasloomad on alustanud munemist (st 7–14 päeva pärast täiskasvanuks saamist). Sellega tagatakse, et katseloomad on munemiseelse etapi juba läbinud ja kultiveerimisnõus olevate isasloomadega paaritunud. Laborikultuurides tehtud vaatlustest nähtub, et isasloomade juuresolekul paarituvad emasloomad kohe või veidi aega pärast täiskasvanuks saamist (Ruf, Vaninnen, isiklikud tähelepanekud). Seitsme päeva pikkune periood on valitud selleks, et hõlbustada ühildamist laboritöö tavarütmiga ja jätta ruumi individuaalse varieeruvuse jaoks lestade arengus. Munemist peaks alustama vähemalt sama palju emasloomi, kui vajatakse hiljem katse jaoks. Näiteks kui katse jaoks on vaja 400 emaslooma, tuleks lasta vähemalt 400 emasloomal kaks kuni kolm päeva muneda. Sünkroonitud populatsiooni saamiseks on vaja vähemalt 1 200 muna (emasloomade osakaal umbes 0,5; suremus umbes 0,2). Kannibalismi ärahoidmiseks on otstarbekas hoida ühes nõus kõige rohkem 20–30 munevat emaslooma.

▼**M6**

5. liide

Ekstraheerimismeetodid

Mikrolülijalgsete puhul on sobiv meetod isendite mullast/substraadist eraldamiseks kuumusega ekstraheerimine (vt joonis allpool). See meetod põhineb organismide aktiivsusel, seega on võimalik registreerida üksnes liikuvad isendid. Kuumusega ekstraheerimise põhimõte seisneb selles, et organismide elutingimusi proovis halvendatakse järk-järgult, mistõttu nad lahkuvad substraadist ja kukuvad fikseerimisvedelikku (nt etanool). Olulised aspektid on seejuures ekstraheerimise kestus ning organismide elutingimuste heast mõõdukaks ja mõõdukast halvaks muutumise gradient. Ekstraheerimise kestus peaks ökotoksikoloogiliste katsete puhul olema võimalikult lühike, sest populatsiooni juurdekasv ekstraheerimise ajal muudaks tulemused ebausaldusväärseks. Teisest küljest peavad proovide temperatuur ja niiskustingimused jääma alati vahemikku, mille puhul lestadel on võimalik liikuda. Mullaproovi kuumutamine toob kaasa substraadi kuivamise. Kui kuivamine on liiga kiire, võib ka mõni lest ära kuivada, enne kui ta jõuab põgeneda.

Seepärast pakutakse välja järgmine meetod (24, 25).

Seade: Tullgreni lehter või muu võrreldav seade, näiteks MacFadyeni lehter (ülaltkuumutusega, proov asetatakse lehtri kohale).

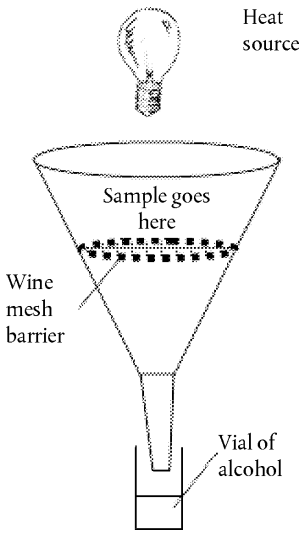
Kuumutusrežiim: 12 tunni vältel 25 °C, 12 tunni vältel 35 °C, 24 tunni vältel 45 °C (kokku 48 tundi). Temperatuuri tuleks mõõta substraadi sees.

Fikseerimisvedelik: 70 % etanool.

Üksikasjalik käik: võetakse katses kasutatud klaasnõu. Selle kaas eemaldatakse ja nõu suu ümber mähitakse tükk võrku või kangast. Kanga ava suurus peaks olema 1,0–1,5 mm. Kangas kinnitatakse kummipaelaga. Nõu pööratakse ettevaatlikult tagurpidi ja asetatakse ekstraheerimisseadmesse. Kangas hoiab ära substraadi pudenemise fikseerimisvedelikku, kuid võimaldab lestadel proovist lahkuda. Kui kõik nõud on paigale asetatud, alustatakse kuumutamist. Ekstraheerimine lõpetatakse 48 tunni pärast. Fikseerimisnõud eemaldatakse ja lestad loendatakse anatoomilise mikroskoobi abil.

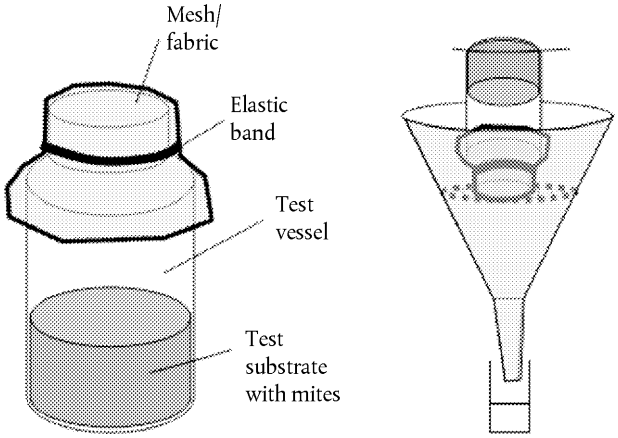
Valitud meetodiga saavutatav ekstraheerimise tõhusus peab olema tõendatud üks või kaks korda aastas tehtava katsega, milles kasutatakse kemikaaliga töötlemata katsesubstraati sisaldavaid nõusid, kus hoitakse teadaoleval arvul noorloomi ja täiskasvanud lesti. Ekstraheerimise keskmine tõhusus peaks kõiki arenguetappe hõlmavate koondtulemuste puhul olema ≥ 90 %.

Tullgreni ekstraheerimisseade



▼**M6**

Katsenõu ettevalmistamine ekstraheerimiseks pärast katse lõppemist



▼**M6**

6. liide

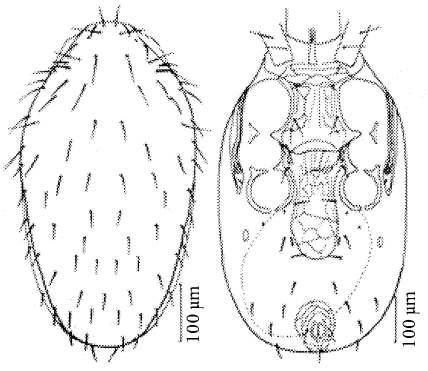
***Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*'i määramine**

Alamklass/selts/alamselts	Sugukond	Perekond/alamperekond/liik
Acari/*Parasitiformes*/*Gamasida*	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

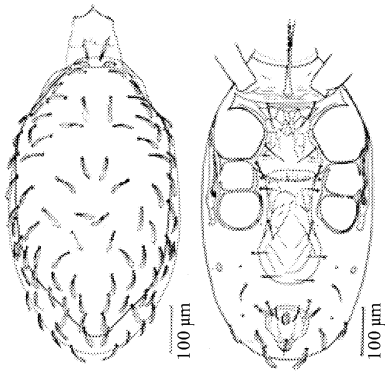
Autor ja kuupäev	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23. jaanuar 2007

Kasutatud kirjandus	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Die Tierwelt Deutschlands, 59. Teil. (2. muudetud väljaanne.) Lk 1–523. Hughes, A. M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9. 400 lk. Krantz, G. W. (1978). A Manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc. 509 lk.

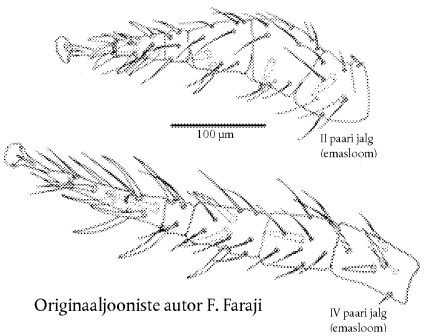
Määramiseks olulised tunnused	Kilp kumera hammasja servaga; hüpostoomi soontes üle 6 hambakese; tagumised seljaharjased Z4 mitte väga pikad; seljaharjased harjasekujulised; genitaalkilp tavapärase suurusega, mitte oluliselt suurenenud, ei ulatu anaalkilbini; seljakilbi tagumisel poolel puuduvad paarumata harjased; II ja IV jalapaaril mõned suured paksud harjased; seljaharjased Z5 umbes kaks korda pikemad kui J5; lõugtundla liikumatul lülil 12–14 hammast ja liikuval lülil 2 hammast; idiosoomi pikkus 520–680 µm. Bioloogilises tõrjes kasutatakse ka liiki *Hypoaspis miles* ning see võidakse *H. aculeifer* iga segi ajada. Peamine erinevus on järgmine: *H. miles* kuulub alamperekonda *Cosmolaelaps* ja sellel liigil on noakujulised seljaharjased, samas kui *H. aculeifer* kuulub alamperekonda *Geolaelaps* ja tema seljaharjased on harjasekujulised.



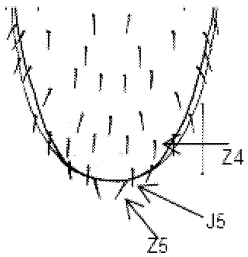
Hypoaspis aculeifer Hughesi järgi (Hughes,1976)



Hypoaspis miles Hughesi järgi (Hughes,1976)



Originaaljooniste autor F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
seljakilp iseloomulike harjastega

▼M6

7. liide

Põhiteave *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*'i bioloogia kohta

Hypoaspis aculeifer kuulub sugukonda *Laelapidae*, seltsi *Acari* (lestad), klassi *Arachnida*, hõimkonda *Arthropoda*. Selle liigi esindajaid leidub iga tüüpi mullas ning nad toituvad teistest lestadest, ümarussidest, valgeliimuklastest ja hooghännalistest (26). Toidunappuse korral lähevad nad üle kannibalismile (27). Röövlestade keha jaguneb idiosoomiks ja gnatosoomiks. Idiosoom ei ole selgelt jagunenud prosoomiks (pearindmik) ja opistosoomiks (tagakeha). Gnatosoomil (näokilp) paiknevad toitumiseks kasutatavad suised: lõugkobijad ja lõugtundlad. Lõugtundlad on kolmeharulised ja neil on eri kujuga hambad. Isasloomad kasutavad lõugtundlaid peale toiduneelamise peamiselt spermatofooride ülekandmiseks emasloomadele. Seljakilp katab peaaegu kogu idiosoomi. Suure osa emaslooma idiosoomist võtavad enda alla suguorganid, mis muutuvad eriti märgatavaks veidi aega enne munemist. Kõhuosal on kaks kilpi: rinnakukilp ja genitaalkilp. Kõik jalad on varustatud harjaste ja ogadega. Harjaseid kasutavad lestad enda kohalhoidmiseks mullas või mullapinnal liikumisel. Esimest paari jalgu kasutatakse peamiselt tundlatena. Teist paari jalgu kasutatakse liikumise kõrval ka saagi haaramiseks. Neljandal jalapaaril paiknevaid ogasid kasutatakse nii kaitseks kui ka edasiliikumiseks (28). Isasloomade pikkus on 0,55–0,65 mm ja kaal 10–15 µg. Emasloomade pikkus on 0,8–0,9 mm ja nad kaaluvad 50–60 µg (8, 28) (joonis 1).

Joonis 1.

***H. aculeifer*'i emasloom, isasloom, protonümf ja vastne.**



Temperatuuril 23 °C saavad lestad suguküpseks 16 päevaga (emasloomad) või 18 päevaga (isasloomad) (6). Seemnerakud viiakse emaslooma solenostoomi ja sealt liiguvad need edasi munasarja. Munasarjas toimub seemnerakkude küpsemine ja säilitamine. Viljastamine leiab aset alles pärast seemnerakkude küpsemist munasarjas. Emasloomad munevad viljastatud või viljastamata munarakud eraldi või kogumikena eelistatult pragudesse või aukudesse. Paaritunud emasloomad saavad kummastki soost järglasi, samas kui paaritumata emasloomadel kooruvad üksnes isased noorloomad. Täiskasvanuks saamiseks läbitakse neli arenguetappi (munast vastseks, vastsest protonümfiks, protonümfist deutonümfiks, deutonümfist täiskasvanuks).

Munad on piimjasvalged, klaasjad, ovaalsed, umbes 0,37 mm pikkused ja kõva kestaga. Vastavalt allikale 8 on vastsete pikkus 0,42–0,45 mm. Neil on vaid kolm paari jalgu. Peaosas on lõugkobijad ja lõugtundlad juba välja arenenud. Mõne väikese hambaga lõugtundlaid kasutatakse munast koorumiseks. Esimese kestamise järel, mis toimub 1–2 päeva pärast koorumist, arenevad välja protonümfid. Nad on samuti valged, nende pikkus on 0,45–0,62 mm (8) ja neil on neli paari jalgu. Lõugtundlatel on kõik hambad olemas. Selles etapis alustavad lestad toitumist. Sel otstarbel torgatakse lõugtundlad läbi saaklooma kutiikuli ja tema

▼**M6**

kehasse eritatakse sekreeti kehaväliseks seedimiseks. Seejärel saab lest vedeldatud toidu sisse imeda. Lõugtundlaid saab kasutada ka toidutükkidest suuremate osakeste rebimiseks (28). Pärast veel ühte kestamist arenevad välja deutonümfid. Nad on 0,60–0,80 mm pikkused (8) ja nende värvus varieerub kollasest helepruunini. Alates sellest etapist on võimalik eristada emasloomi isasloomadest. Veel ühe kestamise järel, mille vältel loomad ei ole aktiivsed ja neil areneb välja pruun kilp (umbes 14 päeva möödudes), on lestad täiskasvanud (28, 29, 30). Nende eluiga 25 °C juures on 48–100 päeva (27).

▼**M6**

8. liide

***Hypoaspis*'ega katse tegemiseks vajalike toimingute kokkuvõte ja ajakava**

Aeg (päevades) (katse alustamise päev = 0-päev)	Tegevus/ülesanne
28–35 päeva enne katset	Emasloomad viiakse sünkroonimise alustamiseks tüvikultuurist puhastesse nõudesse 2 päeva hiljem: emasloomad eemaldatakse Kaks kuni kolm korda nädalas: lisatakse piisavas koguses sööta
5 (± 2) päeva enne katset	Valmistatakse kunstlik muld
4 (± 2) päeva enne katset	Määratakse kunstliku mulla veemahutavus Lastakse öö läbi kuivada Järgmisel päeval: proovid kaalutakse ja arvutatakse veemahutavus
4 (± 2) päeva enne katset	Kunstlik muld eelniisutatakse, et saavutada niiskusesisaldus 20–30 % veemahutavusest
Katse alustamise päev (0-päev)	Alustatakse katset: uuritav kemikaal lisatakse kunstlikule mullale Igasse paralleelnõusse viiakse 10 emaslooma Kõik paralleelnõud kaalutakse Valmistatakse abiootilised kontrollproovid niiskusesisalduse ja pH mõõtmiseks – 2 paralleelproovi iga kontsentratsiooni kohta Niiskusesisalduse määramiseks valmistatud kontrollproovidel lastakse öö läbi kuivada Järgmisel päeval: niiskusesisalduse määramiseks valmistatud kontrollproovid kaalutakse Järgmisel päeval: mõõdetakse kuivatatud abiootiliste kontrollproovide pH
3., 6., 9., 12. päev (ligikaudne)	Igasse paralleelnõusse lisatakse piisav kogus saakloomi Kõik paralleelnõud kaalutakse ja lisatakse vett aurustunud vee asendamiseks
14. päev	Katse lõpetatakse, alustatakse ekstraheerimist kõikidest paralleelproovidest ja ekstraheerimise tõhususe hindamiseks valmistatud kontrollproovidest Veesisalduse määramiseks valmistatud kontrollproovidel lastakse öö läbi kuivada Järgmisel päeval: veesisalduse määramiseks valmistatud kontrollproovid kaalutakse Järgmisel päeval: mõõdetakse kuivatatud kontrollproovide pH
16. päev	Ekstraheerimine lõpetatakse
16. päevale järgnevad päevad	Registreeritakse täiskasvanud ja noorloomade arv ekstraheeritud materjalis Esitatakse tulemused, kasutades näidistabeleid Esitatakse katseprotokoll, kasutades katseprotokolli vormi.

▼M6

C.37. 21-PÄEVANE KATSE KALADEGA: LÜHIAJALINE SÕELKATSE ÖSTROGEENSE JA ANDROGEENSE TOIME NING AROMATAASI INHIBEERIMISE KONTROLLIMISEKS

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 230 (2009). Vajadus töötada välja ja valideerida kaladega tehtav katse, millega saab välja selgitada teatavaid endokriinsüsteemi mõjutavaid kemikaale, tuleneb murest, et keskkonnas esinev kemikaali kontsentratsioon võib avaldada kahjulikku mõju nii inimesele kui ka loomadele, kuna kõnealused kemikaalid mõjutavad endokriinsüsteemi. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate juhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud endokriinsüsteemi kahjustajad ja katsetada neid. Üks tegevussuund oli töötada välja katsejuhend kemikaalide sõeluuringu tegemiseks, et selgitada välja kemikaale, mis mõjutavad kalade endokriinsüsteemi. 21-päevane kalade endokriinsüsteemi sõeluuring on läbinud ulatusliku valideerimisprogrammi teatavate kemikaalide laboritevaheliste uuringutega, millega tõendati, et katse annab asjakohaseid ja usaldusväärseid tulemusi östrogeense toimega või aromataasi inhibeerivate kemikaalide kindlakstegemisel (1, 2, 3, 4, 5) kolme kalaliigi puhul (tüse tõmpnina, jaapani riisikala ja vöötdaanio); androgeense toime kindlakstegemine on võimalik tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala, kuid mitte vöötdaanio puhul. Käesolev katsemeetod ei võimalda kindlaks teha antiandrogeenseid kemikaale. Valideerimise on vastastikuse eksperdihinnangu korras läbi vaadanud katsejuhendite programmi (6) riiklike koordinaatorite määratud ekspertide komisjon. Katse eesmärk ei ole määrata konkreetset hormonaalse häire mehhanismi, kuna katseloomadel on töökorras hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS-) telg, mis võib reageerida kemikaalidele, mis mõjutavad HAS-telge eri tasanditel. Kalade lühiajalises paljunemise katses (OECD katsejuhend nr 229) uuritakse tüseda tõmpnina sigivust ja, kui see on asjakohane, sugunäärmete histopatoloogiat, samuti määratakse kõiki näitajaid, mida uuritakse käesoleva katsemeetodiga. OECD katsejuhend nr 229 võimaldab sõelkatsega kindlaks teha kemikaale, mis eri mehhanismide, sealhulgas endokriinsüsteemi kaudu mõjutavad paljunemist. Neid võimalikke mehhanisme tuleks kaaluda, et valida kõige sobivam katsemeetod.

2. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* sõeluuringus hoitakse marja heitvaid emaskalu ja suguküpseid isaskalu koos ja kemikaaliga kokkupuutes nende elutsükli piiratud osa (21 päeva) jooksul. 21-päevase kokkupuuteperioodi lõpus mõõdetakse isas- ja emaskaladel, sõltuvalt liigist, üht või kaht bioloogilist näitajat, millest tehakse järeldused uuritava kemikaali östrogeense, aromataasi inhibeeriva või androgeense toime kohta; need näitajad on vitellogeniin ja teisesed sootunnused. Vitellogeniini määratakse nii tüseda tõmpnina, jaapani riisikala kui ka vöötdaanio puhul; teiseseid sootunnuseid mõõdetakse üksnes tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul.

3. Käesolevat bioloogilist katsemeetodit saab kasutada *in vivo* sõeluuringuks teatavate endokriinsete toimete puhul ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Endokriinsüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” osana (28).

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. Vitellogeniini sünteesitakse tavaliselt ovipaarsete selgroogsete emasloomade maksas vastuseks veres ringlevale endogeensele östrogeenile. See on munarebu valkude eelkäija ja pärast sünteesimist maksas liigub see verega munasarjadesse, kus arenevad munarakud seda seovad ja modifitseerivad. Vitellogeniin on peaaegu tuvastamatu isaskalade ja ebaküpsete emaskalade vereplasmas, kuna sellistel kaladel ei ole vereringes piisavalt östrogeeni, kuid nende maks on võimeline vitellogeniini sünteesima ja verre eritama vastuseks stimuleerimisele eksogeense östrogeeniga.

▼M6

5. Vitellogeniini mõõtmise kaudu tehakse kindlaks kemikaalid, millel on mitmesuguseid östrogeenseid toimeid. Östrogeense toimega kemikaale on võimalik tuvastada vitellogeniini mõõtmisega isaskalades ja see on eelretsenseeritud teaduskirjanduses hästi tõendatud (nt (7)). Samuti on tõendatud, et vitellogeniini toodetakse pärast kokkupuudet aromatiseeritavate androgeenidega (8, 9). Kui emaskalade veres vähendatakse östrogeeni taset, näiteks sellega, et inhibeeritakse ensüüm aromataasi, mis muundab endogeense androgeeni looduslikuks östrogeeniks 17β-östradiooliks, põhjustab see vitellogeniini kontsentratsiooni vähenemise; seda kasutatakse selliste kemikaalide leidmiseks, mis inhibeerivad aromataasi (10, 11). Vitellogeniini tasemes pärast kokkupuudet östrogeeniga või aromataasi inhibiitoriga ilmneva toime bioloogiline olulisus on hästi tõendatud. Siiski on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus, näiteks hepatotoksilisus.

6. Välja on töötatud ja tavakasutamiseks edukalt standarditud mitu mõõtmismeetodit. Nende hulgas on liigispetsiifilised ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodid, milles vitellogeniini mõõtmiseks üksikisenditelt saadud väikestes vere- või maksaproovides kasutatakse immunokeemiat (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Vitellogeniini mõõtmiseks võetakse tüseda tõmpnina vereproov, vöötdaanio vereproov või pea-saba homogenaat ja jaapani riisikala maks. Jaapani riisikala puhul on vitellogeniini verest ja maksast määramise tulemused omavahel heas korrelatsioonis (19). 6. liites on esitatud soovitatavad proovivõtumeetodid vitellogeniini määramiseks. Laialdaselt kättesaadavad on vitellogeniini mõõtmise komplektid; sellised komplektid peaksid põhinema valideeritud liigispetsiifilisel ELISA meetodil.

7. Teatavate liikide isaskalade teisesed sootunnused on väliselt nähtavad, mõõdetavad ja sõltuvad endogeensete androgeenide tasemest vereringes; see on nii tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul, kuid mitte vöötdaanio puhul, kellel ei ole mõõdetavaid teiseseid sootunnuseid. Emaskaladel säilib võime omandada isaskalale iseloomulikud teisesed sootunnused, kui nad puutuvad kokku vees olevate androgeensete kemikaalidega. Teaduskirjandusest võib leida mitu uuringut, milles on tõendatud tüseda tõmpnina (20) ja jaapani riisikala (21) selline reageerimine androgeensetele kemikaalidele. Teiseste sootunnuste vähenemist isaskaladel tuleks tõlgendada ettevaatusega, kuna selliste andmete statistiline võimsus on väike; tõlgendamisel tuleks toetuda eksperdiarvamusele ja võtta arvesse tõendite kaalukust. Vöötdaanio kasutamisele selles katses on piiranguid, kuna sellel kalal puuduvad mõõdetavad teisesed sootunnused, mille kaudu hinnata reaktsiooni androgeense toimega kemikaalidele.

8. Tüseda tõmpnina puhul on eksogeensete androgeenidega kokkupuute peamine näitaja pulmarüü kõbrukeste arv emaskala ninamikul. Jaapani riisikala puhul on nn papillaarjätked peamine tunnus, et emaskala on kokku puutunud eksogeensete androgeensete kemikaalidega. 5.A ja 5.B liites on esitatud soovitatavad meetodid vastavalt tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala sootunnuste hindamiseks.

9. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

10. Katses viiakse paljunemisvõimelised isas- ja emaskalad katsenõudes kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Kuna nad on täiskasvanud ja paljunemiseas, on kumbagi sugu kerge eristada; samuti on võimalik analüüsida nende sootunnuseid iga otsitava näitaja määramiseks ning see tagab ka nende tundlikkuse väliste kemikaalide suhtes. Katse lõpus määratakse nende sugu sugunäärmete makroskoopilise vaatlusega pärast seda, kui kõht on

▼**M6**

kääridega lahti lõigatud. Vastavate biokatse tingimuste ülevaade on esitatud 2. liites. Katset alustatakse tavaliselt kaladega, kes on võetud kudemisvalmis populatsioonist; vanu kalu ei tohiks kasutada. Juhised kalade vanuse ja paljunemisvõimelisuse kohta on esitatud kalade valikut käsitlevas punktis. Katse tehakse kemikaali kolmel kokkupuutekontsentratsioonil ning, vee kontrollrühmaga ja vajaduse korral ka lahusti kontrollrühmaga. Uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni kohta kasutatakse jaapani riisikala ja vöötdaanio puhul kahte nõu või paralleelkatset (kummaski nõus 5 isas- ja 5 emaskala) ning tüseda tõmpnina korral nelja nõu või paralleelkatset (igas nõus 2 isas- ja 4 emaskala). Sellega võetakse arvesse isase tüseda tõmpnina territooriumikäitumist, kuid säilitatakse samal ajal katse piisav statistiline võimsus. Kokkupuude kemikaaliga toimub 21 päeva ja kaladelt võetakse proovid kokkupuute 21. päeval.

11. Proovivõtmisel 21. päeval surmatakse kõik kalad humaanselt. Tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul mõõdetakse teisesed sootunnused (vt 5.A ja 5.B liide); vöötdaaniolt ja tüsedalt tõmpninalt võetakse vereproovid vitellogeniini määramiseks; vöötdaaniolt võib selle asemel koguda vitellogeniini määramiseks pea ja saba (6. liide); jaapani riisikalalt võetakse vitellogeniini määramiseks maks (6. liide).

KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID

12. Katsetulemused on nõuetekohased, kui on täidetud järgmised tingimused:

— suremus vee (või lahusti) kontrollrühmades ei tohiks kokkupuuteperioodi lõpuks ületada 10 %;

— lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist kogu kokkupuuteperioodi jooksul;

— vee temperatuur ei tohiks kogu kokkupuuteperioodi jooksul katsenõudes erineda rohkem kui ± 1,5 °C ja see tuleks hoida vahemikus ± 2 °C katsealusele liigile ettenähtud temperatuurist (2. liide);

— peaksid olema tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus ± 20 % mõõdetud keskmisest väärtusest.

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

13. Tavalised laboriseadmed, eeskätt järgmised:

a) hapniku- ja pH-mõõtur;

b) seadmed vee kareduse ja leelisuse määramiseks;

c) asjakohased temperatuuri reguleerimise ja eelistatavalt pideva jälgimise seadmed;

d) soovitatava laadimisnormi ja loomkoormuse jaoks piisava suurusega keemiliselt inertsest materjalist mahutid (vt 2. liide);

e) tüseda tõmpnina ja vöötdaanio kudemissubstraat; vajalikud üksikasjad vt 4. liide;

f) sobiva täpsusega kaalud (st täpsusega ± 0,5 mg).

▼M6

Vesi

14. Uuringus võib kasutada sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui ± 0,5 pH-ühikut. Selle tagamiseks, et lahjendusvesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi (näiteks uuritava kemikaaliga kompleksimoodustamise kaudu), tuleks vaheaegade järel võtta proove analüüsimiseks. Kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskmetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} ja SO_4^{2-}) ning pestitsiidide sisaldus (näiteks fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus), orgaanilise süsiniku üldsisaldus ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks iga kolme kuu järel. Kui on tõendatud, et vee kvaliteet on vähemalt ühe aasta jooksul püsiv, võib neid määramisi teha harvem (nt iga kuue kuu järel). 3. liites on esitatud mõned lahjendusvee nõutavad keemilised omadused.

Katselahused

15. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamisega. Põhilahus tuleks eelistatavalt valmistada lihtsalt uuritava kemikaali segamise või loksutamisega lahjendusvees, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid (nt segamist või ultraheli). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne). Lahusti kasutamine ei ole soovitatav. Kui lahusti on ikkagi hädavajalik, tuleb katses paralleelselt teha lahusti kontrolli katse samal lahusti kontsentratsioonil, mida kasutatakse uuritava kemikaaliga kokkupuute katsetes. Raskesti uuritava kemikaali puhul võib lahusti olla tehniliselt parim lahendus; sel juhul tuleks vaadata OECD juhenddokumenti (22) raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta. Lahusti valiku määravad kemikaali füüsikalis-keemilised omadused. OECD juhenddokumendis soovitatakse kontsentratsiooni kuni 100 µl/l, millest tuleks kinni pidada. Kuid hiljutises ülevaates (23) tõsteti esile täiendavaid probleeme, mis tekivad, kui endokriinse toime uurimisel kasutatakse lahustit. Seetõttu soovitatakse, et kui lahusti on vajalik, peaks selle kontsentratsioon olema tehnilist teostatavust arvestades minimaalne (see sõltub uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest).

16. Katses kasutatakse läbivoolusüsteemi. Sellises süsteemis lisatakse ja lahjendatakse uuritava kemikaali põhilahust pidevalt (nt dosaatorpumba, proportsionaalse lahjendamise seadme ja küllastamissüsteemiga), et tekitada eri katsekambrites rida erinevaid kontsentratsioone. Põhilahuste ja lahjendusvee voolukiirust tuleb kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev, ja see ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu katse jooksul. Tuleks hoiduda kasutamast ebakvaliteetseid plastiktorusid või muid materjale, mis võivad sisaldada bioloogiliselt aktiivseid kemikaale. Materjali valimisel läbivoolusüsteemi jaoks tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali võimalikku adsorbeerumist.

Kalade pidamine

17. Katsealused kalad tuleks valida ühest laboripopulatsioonist, eelistatavalt samast parvest, mida on vähemalt kahe nädala vältel enne katset kohandatud selliste veekvaliteedi ja valgustustingimustega, mis sarnanevad katses kasutatavatele. On oluline, et laadimisnorm ja loomkoormus (vt mõisted, 1. liide) sobiksid katses kasutatavale liigile (vt 2. liide).

18. Pärast 48-tunnist stabiliseerumisperioodi registreeritakse surmajuhtumid ja rakendatakse järgmisi kriteeriume:

▼M6

— kui suremus on seitsme päeva jooksul suurem kui 10 % populatsioonist, jäetakse kogu partii kõrvale;

— kui suremus on populatsioonist 5–10 %, lastakse kaladel kohaneda veel seitse päeva; kui nende järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, jäetakse kogu partii kõrvale;

— kui suremus on seitsme päeva jooksul väiksem kui 5 % populatsioonist, loetakse partii vastuvõetavaks.

19. Kohanemise ajal, kokkupuutele eelneval perioodil ja kokkupuute ajal ei tohiks kaladel haigusi ravida.

Kokkupuute-eelne periood ja kalade valimine

20. Soovitatakse kasutada ühenädalast kokkupuute-eelset perioodi, kus kalad pannakse nõudesse, mis on sarnased tegelikus katses kasutatavatele. Kalu tuleks sööta *ad libitum* kogu pidamisperioodi ja katse vältel. Kokkupuute-perioodi tuleks alustada eristatavate sootunnustega kummastki soost täiskasvanud kaladega, kes pärinevad labori suguküpsete kalade varudest (nt nende teisesed sootunnused on tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul selgelt nähtavad) ning kes aktiivselt koevad. Üksnes üldiseks orienteerumiseks tuleb öelda (ja seejuures ei tohi jätta arvestamata konkreetse kalapartii tegelikku paljunemiskäitumist), et tüseda tõmpnina vanus peaks olema ligikaudu 20 (± 2) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril 25 ± 2 °C. Jaapani riisikala vanus peaks olema ligikaudu 16 (± 2) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril 25 ± 2 °C. Vöötdaanio vanus peaks olema ligikaudu 16 (± 2) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril 26 ± 2 °C.

KATSE KAVANDAMINE

21. Kasutatakse uuritava kemikaali kolme kontsentratsiooniga rühmi, üht (vee) kontrollrühma ja vajaduse korral üht lahusti kontrollrühma. Andmeid võib analüüsida, et teha kindlaks statistiliselt olulised erinevused kemikaaliga kokku puutunud rühma ja kontrollrühma näitajate vahel. Kõnealune analüüs näitab, kas uuritava kemikaaliga saadud andmeid võib kasutada riskihindamisel või oleks vaja teha täiendav pikemaajaline katse kahjuliku mõju (ellujäämisele, arengule, kasvule ja paljunemisele avalduv mõju) väljaselgitamiseks (24).

22. Vöötdaanio ja jaapani riisikala puhul võetakse katse 21. päeval isas- ja emaskalad igast kontsentratsioonitaseme rühmast (5 isas- ja 5 emaskala kummastki paralleelkatsest) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniin ja vajaduse korral teisesed sootunnused. Tüseda tõmpnina puhul võetakse kokkupuute 21. päeval isas- ja emaskalad igast kontsentratsioonitaseme rühmast (2 isas- ja 4 emaskala igast paralleelkatsest; paralleelkatseid tehakse neli) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniin ja teisesed sootunnused.

Katsekontsentratsioonide valimine

23. Selle katse puhul peab kõrgeim katsekontsentratsioon olema maksimaalne talutav kontsentratsioon (MTC), mis tehakse kindlaks vahemiku leidmise katsega või muude mürgisuse andmete põhjal, 10 mg/l või vees lahustuvuse piirkontsentratsioon, olenevalt sellest, milline neist on väikseim. Uuritava kemikaali maksimaalne talutav kontsentratsioon on suurim kontsentratsioon, mille puhul suremus on väiksem kui 10 %. Sellise lähenemisviisi kasutamiseks on vaja empiirilisi andmeid ägeda mürgisuse kohta või muid mürgisuse andmeid, mille põhjal saab hinnata maksimaalse talutava kontsentratsiooni. Sellise kontsentratsiooni hindamine võib olla ebatäpne ja tavaliselt nõuab see erialateadmisi.

▼M6

24. Katse on vaja teha kolmel kontsentratsioonil, mis erinevad konstantse kordaja võrra, mis võib olla kuni 10; lisaks tuleb teha kontrollkatse lahjendusveega (ja vajaduse korral ka lahusti kontrollkatse). Soovitatav on, et kontsentratsioonide suhtarv oleks vahemikus 3,2 kuni 10.

KATSE KÄIK

Katsealuste kalade valimine ja kaalumine

25. Tähtis on, et kalade kehamassi erinevused katse alguses oleksid minimaalsed. 2. liites on esitatud käesolevas katsemeetodis eri liikide puhul soovitatavad suurusevahemikud. Kogu katses kasutatava kalade partii puhul peaksid katse alguses isas- ja emaskalade individuaalse kehamassi erinevused olema vahemikus ± 20 % samasooliste kalade aritmeetilisest keskmisest. Soovitatav on enne katset kaaluda samast kalade partiist osaproov, et arvutada välja keskmine kaal.

Kokkupuutetingimused

Kestus

26. Katse kestab 21 päeva alates kokkupuute-eelse perioodi lõppemisest. Soovitatav kokkupuute-eelne periood on üks nädal.

Söötmine

27. Kalu tuleks sööta sobiva söödaga (2. liide) *ad libitum* ja piisaval määral, et nende organism oleks heas seisundis. Hoolt tuleb kanda mikroobide kasvu ja vee hägustumise ärahoidmise eest. Üldreeglina võib päevaratsiooni jagada kaheks või kolmeks võrdseks osaks ja sööta kalu mitu korda päevas vähemalt kolmetunniste vaheaegadega. Ühekordne suurem söödakogus on samuti lubatav, eelkõige nädalalõpul. Kalu ei tohiks sööta 12 tunni jooksul enne proovivõtmist/lahkamist.

28. Kalasööda kohta peaks olema teada saasteainete, näiteks kloororgaaniliste pestitsiidide, polütsükliliste aromaatsete süsivesinike (PAH) ja polüklooritud bifenüülide (PCB) sisaldus. Suure fütoöstrogeenisisaldusega sööta, mis maskeeriks kalade reaktsiooni teadaolevale östrogeeni agonistile (nt 17β-östradiool), ei tohiks kasutada.

29. Sööda ülejäägid ja väljaheited tuleks eemaldada katsenõudest vähemalt kaks korda nädalas, näiteks iga nõu põhja ettevaatliku puhastamisega sifooni abil.

Valgus ja temperatuur

30. Valgustusperiood ja veetemperatuur peaksid olema katseliigile sobivad (vt 2. liide).

Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus

31. Enne kokkupuuteperioodi alustamist tuleks tagada kemikaali lisamise süsteemi nõuetekohane toimimine. Kõik vajalikud analüüsimeetodid peaksid olema kontrollitud, sealhulgas peaks olema kontrollitud uuritava kemikaali stabiilsus katsesüsteemis. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid korrapäraste ajavahemike tagant järgmiselt: lahjendusvee ja põhilahuste voolu kiirust tuleks katse jooksul eelistatavalt kontrollida iga päev, kuid vähemalt kaks korda nädalas, ja see ei tohiks kogu uuringu jooksul varieeruda rohkem kui 10 %. Uuritava kemikaali tegelik kontsentratsioon soovitatakse määrata kõikides nõudes katse alguses ja seejärel nädalaste vaheaegadega.

32. On soovitatav, et tulemused põhineksid mõõdetud kontsentratsioonidel. Kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % nominaalsest kontsentratsioonist kogu katse jooksul, võivad tulemused põhineda nominaalsetel või mõõdetud väärtustel.

33. Proove võib olla vaja filtrida (nt läbi 0,45 μm suuruste pooridega filtri) või tsentrifuugida. Sellise vajaduse korral tuleks eelistada tsentrifuugimist. Kuid kui uuritav aine ei adsorbeeru filtritel, on ka filtrimine lubatud.

▼M6

34. Katse ajal mõõdetakse lahustunud hapniku sisaldust, temperatuuri ja pH-d kõigis katsenõudes vähemalt kord nädalas. Üldkaredust ja leelisust tuleks kontrollkatse nõudes ja ühes suurima kontsentratsiooniga katse nõus mõõta vähemalt kord nädalas. Temperatuuri tuleks eelistatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katseanumas.

Vaatlused

35. Katse käigus või katse lõpetamisel hinnatakse mitut üldist näitajat (nt ellujäämine) ja mitut bioloogilist põhinäitajat (nt vitellogeniini tase). Allpool on kirjeldatud nende näitajate mõõtmist ja hindamist ning nende kasulikkust.

Ellujäämine

36. Kalad tuleks katseperioodi jooksul üle vaadata iga päev; kõik surmajuhtumid tuleks registreerida ja surnud kalad eemaldada võimalikult kiiresti. Surnud kalu ei tohiks asendada ei kontrollrühma(de) ega ka katserühmade nõudes. Katse ajal surnud kalade sugu tuleks määrata sugunäärmete makroskoopilise hindamisega.

Käitumine ja välimus

37. Igasugune ebatavaline käitumine (võrreldes kontrollrühmaga) tuleks registreerida; see võib hõlmata üldise mürgisuse tunnuseid, nagu hingeldamine, koordineerimata ujumine, tasakaalu kaotamine, ebatüüpiline liikumatus või söömine. Lisaks tuleb registreerida välised anomaaliad (näiteks veritsus, värvuse nõrgenemine). Selliseid mürgisuse tunnuseid tuleks andmete tõlgendamisel hoolikalt kaaluda, kuna need võivad viidata kemikaali kontsentratsioonile, millel endokriinse toime biomarkerid ei ole usaldusväärsed. Sellised käitumise vaatlused võivad samuti anda kasulikku kvalitatiivset teavet selle kohta, milliseid nõudeid tuleks edaspidi järgida kaladega tehtavate katsete puhul. Näiteks on tüseda tõmpnina puhul täheldatud normaalsetel isaskaladel või maskuliniseerunud emaskaladel androgeense kemikaaliga kokkupuute tagajärjel territooriumiga seotud agressiivsust; vöötdaanio puhul on tavaline paaritumis- ja kudemiskäitumine – koidikul pärast valgeks minemist – östrogeense või antiandrogeense kemikaaliga kokkupuute tagajärjel takistatud või ilmneb vähem.

38. Kuna mõned välistunnused (eelkõige värvus) võivad kala käsitsemise käigus kiiresti muutuda, on oluline registreerida kvalitatiivsed tähelepanekud enne kalade katsesüsteemist välja võtmist. Tüseda tõmpninaga saadud seniste kogemuste kohaselt võivad mõned endokriinse toimega kemikaalid esialgu tekitada muutusi järgmistes välistes tunnustes: keha värvus (hele või tume), värvumismuster (vertikaalsete vöötide olemasolu) ja kehakuju (pea ja rinnaosa). Seepärast tuleks kogu katse jooksul ja pärast katse lõpetamist jälgida kalade füüsilist välimust ja registreerida muutused.

Kalade humaanne surmamine

39. 21. päeval, st kemikaaliga kokkupuute lõpetamisel tuleks kalad humaanselt surmata vajaliku koguse trikaiiniga (trikaiinmetaansulfonaat, metakaiin, MS-222 (CASi nr 886-86-2), 100–500 mg/l), mis on limaskesta ärrituse vähendamiseks puhverdatud 300 mg/l $NaHCO_3$-ga (naatriumvesinikkarbonaat, CASi nr 144-55-8); seejärel võetakse veri või koed vitellogeniini määramiseks, nagu on selgitatud jaotises „Vitellogeniin”.

▼M6

Teiseste sootunnuste vaatlemine

40. Mõned endokriinse toimega kemikaalid võivad põhjustada muutusi spetsiifilistes teisestes sootunnustes (pulmarüü köbrukeste arv isasel tüsedal tõmpninal, isase jaapani riisikala papillaarjätked). Teatava toimemehhanismiga kemikaalid võivad põhjustada teiseste sootunnuste ebanormaalset ilmumist vastassoost isenditel; näiteks sellised androgeeniretseptori agonistid nagu trenboloon, metüültestosteroon ja dihüdrotestosteroon võivad põhjustada emasel tüsedal tõmpninal silmapaistvate pulmarüü köbrukeste tekkimise või emasel riisikalal papillaarjätkete väljaarenemise (11, 20, 21). Samuti on teatatud, et östrogeeniretseptori agonistid võivad vähendada pulmarüü köbrukeste arvu ja täiskasvanud isaskala turjapadjandi suurust (25, 26). Sellised üldised morfoloogilised vaatlused võivad samuti anda kasulikku kvalitatiivset ja kvantitatiivset teavet selle kohta, milliseid nõudeid tuleks edaspidi järgida kaladega tehtavate katsete puhul. Tüseda tõmpnina pulmarüü köbrukeste arvu ja suurust ning jaapani riisikala papillaarjätkeid saab kas otse või mugavamini mõõta fikseeritud isenditel. Tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala teiseste sootunnuste hindamise soovitatav kord on esitatud vastavalt 5.A ja 5.B liites.

Vitellogeniin

41. Veri võetakse sabaarterist või -veenist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartoruga või selle asemel süstla abil tehtava südamepunktsiooniga. Sõltuvalt kala suurusest on kogutava vere maht tüseda tõmpnina isendi puhul üldiselt vahemikus 5–60 µl ja vöötdaanio isendi puhul 5–15 µl. Plasma eraldatakse verest tsentrifuugimisega ja seda hoitakse koos proteaasiinhibiitoritega – 80 °C juures kuni vitellogeniini määramiseni. Teise võimalusena kasutatakse vitellogeniini määramiseks kudede allikana jaapani riisikala maksa või vöötdaanio pea-saba homogenaati (6. liide). Vitellogeniin tuleks mõõta valideeritud homoloogse ELISA meetodiga, kasutades homoloogset vitellogeniini standardit ja homoloogseid antikehi. Soovitatav on kasutada meetodit, millega on võimalik tuvastada vitellogeniini nii väikeses sisalduses kui mõni ng plasma ml kohta (või ng koe mg kohta), mis on tausttase kemikaaliga mitte kokku puutunud isaskalas.

42. Vitellogeniini mõõtmise kvaliteeti kontrollitakse standardite ja tühikatsetega ning vähemalt kahe mõõtmise tegemisega. Iga ELISA meetodi puhul tuleb teha maatriksiefekti (proovi lahjendamise mõju) katse, et määrata proovi minimaalne lahjendustegur. Igal ELISA plaadil, mida kasutatakse vitellogeniini määramiseks, peaksid olema järgmised kvaliteedikontrolli proovid: vähemalt 6 kaliibrimisstandardit, mille kontsentratsioonivahemik hõlmab vitellogeniini kontsentratsiooni eeldatavat vahemikku, ja vähemalt üks mittespetsiifilise sidumise tühikatse (kaks paralleelkatset). Nendes tühikatsetes peaks neeldumine olema vähem kui 5 % kaliibrimisstandardi puhul täheldatavast maksimaalsest neeldumisest. Igast proovi lahjendusest analüüsitakse vähemalt kahte alikvooti (kahes paralleelaugus). Kui tulemused paralleelaukudes erinevad rohkem kui 20 %, tuleb teha kordusanalüüs.

43. Kaliibrimisgraafiku korrelatsioonikordaja (R^2) peab olema suurem kui 0,99. Hea korrelatsioon ei ole siiski piisav, et tagada ennustatavate väärtuste õigsus kõigis kontsentratsioonivahemikes. Lisaks kaliibrimisgraafiku piisavalt heale korrelatsioonile peab ka iga standardi kontsentratsioon, mis arvutatakse kaliibrimisgraafiku põhjal, olema vahemikus 70–120 % oma nominaalsest kontsentratsioonist. Kui nominaalsed kontsentratsioonid kalduvad

▼M6

eemalduma kaliibrimise regressioonisirgest (nt madalatel kontsentratsioonidel), võib olla vajalik jagada kaliibrimisgraafik madalale ja kõrgele kontsentratsioonile vastavateks osadeks või kasutada neeldumisandmete lähendamiseks mittelineaarset mudelit, mis neid õigesti kirjeldaks. Kui graafik jagatakse kaheks osaks, peaks kummaski osas olema $R^2 > 0,99$.

44. Avastamispiir (*limit of detection*, LOD) on määratletud kui madalaim analüüsistandardi kontsentratsioon ning määramispiir (*limit of quantitation*, LOQ) on määratletud kui madalaim analüüsistandardi kontsentratsioon, mis on korrutatud väikseima lahjendusteguriga.

45. Igal vitellogeniinianalüüsi tegemise päeval mõõdetakse ka rikastatud proovi, mis on valmistatud eri katsetes kasutatava võrdlusstandardiga (7. liide). Eeldatava kontsentratsiooni ja mõõdetud kontsentratsiooni suhtarv esitatakse koos samal päeval tehtud määramiste tulemustega.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Biomarkerite põhjal mõju hindamine dispersioonanalüüsiga (ANOVA)

46. Kemikaali võimaliku endokriinse mõju tuvastamiseks võrreldakse biomarkerite väärtusi kontrollrühma vastavate näitajatega, kasutades dispersioonanalüüsi (ANOVA). Kui kasutatakse lahusti kontrollrühma, tuleb iga tulemusnäitaja puhul teha asjakohane statistiline test lahjendusvee ja lahusti kontrollrühmade vahel iga tulemusnäitaja jaoks. Juhendid, kuidas kasutada lahjendusvee ja lahusti kontrollrühmade andmeid edasises statistilises analüüsis, võib leida OECD 2006. aasta dokumendis (27). Kõiki bioloogiliste vastuste andmeid tuleks analüüsida ja need esitada eraldi kummagi soo kohta. Kui parameetriliste meetodite vajalikud eeldused ei ole täidetud – tegemist on normaaljaotusest erineva jaotuse (nt Shapiro-Wilki test) või heterogeense hajuvusega (Bartletti test või Levene'i test), tuleks kaaluda andmete teisendamist, et muuta hajuvus enne ANOVA tegemist homogeenseks, või kaalutud ANOVA kasutamist. Kui toime sõltuvus kontsentratsioonist ei ole monotoonne, võib kasutada Dunnetti testi (parameetriline) või mitmest paariviisilist võrdlemist või Manni-Whitney testi Bonferroni parandusega (mitteparameetriline). Kui toime sõltuvus kontsentratsioonist on ligikaudu monotoonne, võib kasutada muid statistilisi teste (nt Jonckheere'i-Terpstra või Williamsi test). 8. liites on esitatud statistilist analüüsi käsitlev otsustusskeem, mis aitab leida kasutamiseks kõige sobivama statistilise testi. Täiendav teave on kättesaadav ka OECD dokumendis, milles käsitletakse praegusi meetodeid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks (27).

Katsetulemuste esitamine

47. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist.

Uurimislabor:

— vastutavad töötajad ja nende kohustused uuringu tegemisel;

— iga labor peaks olema tõendanud oma oskusi, kasutades mitmesuguseid esindavaid kemikaale.

Uuritav kemikaal:

— uuritava kemikaali iseloomustus;

— füüsikalised ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

▼**M6**

— katses kasutatud kontsentratsiooniga lahuste valmistamise meetod ja sagedus;

— teave stabiilsuse ja biolagunduvuse kohta.

Lahusti:

— lahusti iseloomustus (kirjeldus, kasutatud kontsentratsioon);

— lahusti valimise põhjendus (kui lahusti on muu kui vesi).

Katseloomad:

— liik ja liin;

— tarnija ja tema konkreetne käitis;

— kalade vanus katse alguses ja paljunemis-/kudemisseisund;

— loomade aklimatiseerimise korra üksikasjad;

— kalade kehamass kemikaaliga kokkupuute alguses (kalaparvest võetud osaproovi põhjal).

Katsetingimused:

— kasutatud katsemeetod (katse tüüp, laadimisnorm, loomkoormus jne);

— põhilahuse valmistamise meetod ja voolukiirus;

— nominaalsed katsekontsentratsioonid, iga nädal mõõdetud katselahuste kontsentratsioonid ja kasutatud analüüsimeetod, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed ning tõendid selle kohta, et need mõõtmised näitavad uuritava kemikaali kontsentratsiooni tegelikus lahuses;

— lahjendusvee omadused (pH, karedus, leelisus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloorisisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus, hõljuvaine sisaldus ja kõik muud mõõdetud näitajad);

— vee kvaliteet katsenõus: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;

— üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda (söötade) tüüp, päritolu, lisatud kogus ja söötmise sagedus ning asjakohaste saasteainete analüüs (nt polüklooritud bifenüülid, polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud ja kloororgaanilised pestitsiidid).

Tulemused:

— tõendid selle kohta, et kontrollkatsed vastasid nõuetekohasuse kriteeriumidele;

— andmed suremuse kohta iga katsekontsentratsiooni rühmades ja kontrollrühmas;

— kasutatud statistilise analüüsi meetodid, andmete töötlemine ja kasutatud meetodite valimise põhjendus;

— bioloogiliste vaatluste andmed üldiste morfoloogiliste muutuste kohta, sealhulgas teiseste sootunnuste ja vitellogeniini kohta;

▼M6

— andmete analüüsi tulemused, eelistatavalt tabelite ja graafikute kujul;

— kalade ebatavalised reaktsioonid ja nähtavad ilmingud, mida põhjustas uuritav kemikaal.

TULEMUSTE TÕLGENDAMISE JA KATSETULEMUSTE KEHTIVAKS TUNNISTAMISE JUHISED

48. Käesolevas osas on esitatud mõningad kaalutlused, mida tuleks arvesse võtta mitmesuguste mõõdetavate näitajate kohta saadud katsetulemuste tõlgendamisel. Tulemuste tõlgendamisel tuleb olla ettevaatlik, kui uuritav kemikaal põhjustab selgelt mürgitust või mõjutab katseloomade üldist seisundit.

49. Katsekontsentratsioonide vahemiku valimisel tuleks jälgida, et ei ületataks maksimaalset talutavat kontsentratsiooni, muidu ei saa andmeid mõistlikult tõlgendada. On oluline, et vähemalt ühe kontsentratsiooni juures ei ilmneks märke mürgisuse kohta. Haiguse ja toksilise mõju tundemärke tuleks põhjalikult hinnata ja esitada need katseprotokollis. Näiteks on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus, näiteks hepatotoksilisus. Mõju tõlgendamist võivad hõlbustada andmed sellistel kontsentratsioonidel, kus andmeid ei moonuta süsteemne toksilisus.

50. Katsetulemuste kehtivaks tunnistamisel tuleb arvesse võtta mitut aspekti. Juhinduda tuleb sellest, et vitellogeniini tase kontrollrühmades peaks isas- ja emaskaladel olema erinev; erinevus peaks olema ligikaudu kolm suurusjärku tüseda tõmpnina ja vöötdaanio puhul ning umbes üks suurusjärk jaapani riisikala puhul. Valideerimisprotokollides (1, 2, 3, 4) on esitatud näited väärtuste kohta, mis määrati kontrollrühmade ja uuritava kemikaaliga rühmade puhul. Kõrge vitellogeniinitase kontrollrühma isaskaladel võib negatiivselt mõjutada meetodi tundlikkust ja nõrkade östrogeeni agonistide tuvastamise võimet. Madal vitellogeniinitase kontrollrühma emaskaladel võib negatiivselt mõjutada meetodi tundlikkust ning aromataasi inhibiitorite ja östrogeeni antagonistide tuvastamise võimet. Valideerimisuuringuid kasutati selliste suuniste väljatöötamiseks.

51. Kui laboris ei ole asjaomast katset varem tehtud või seal on toimunud olulisi muudatusi (nt on muutunud kalade liin või tarnija), siis on soovitatav teha tehnilise pädevuse uuring. Soovitatav on kasutada kemikaale, millel on terve rida toimemehhanisme või mis avaldavad mõju mitmele otsitavale näitajale. Praktikas kutsutakse iga laborit üles looma varasemate kontrollrühma andmete põhjal oma andmekogu isas- ja emaskalade näitajate kohta ning tegema positiivse kontrolli katse östrogeense toimega kemikaaliga (nt 17β-östradiool kontsentratsioonis 100 ng/l või mõni teadaolev nõrk agonist), mille mõjul tõuseb vitellogeniini tase isaskalades, positiivse kontrolli katse aromataasi pärssiva kemikaaliga (nt fadrosool või prokloraas kontsentratsioonis 300 µg/l), mille tõttu väheneb emaskalade vitellogeniinisisaldus, ning positiivse kontrolli katse androgeense toimega kemikaaliga (nt 17β-trenboloon kontsentratsioonis 5 µg/l), mis põhjustab emastel tüsedatel tõmpninadel ja jaapani riisikaladel isaskalade teiseste sootunnuste ilmumist. Kõiki neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate valideerimisuuringute andmetega (1, 2, 3), et kinnitada labori pädevust.

52. Üldiselt tuleks vitellogeniini mõõtmised lugeda positiivseks, kui tuvastatakse vitellogeniinitaseme statistiliselt oluline ($p < 0,05$) tõus isaskalades või statistiliselt oluline ($p < 0,05$) langus emaskalades vähemalt suurimal katses kasutatud kontsentratsioonil kontrollrühmaga võrreldes, kui samas ei ilmne üldise mürgisuse märke. Positiivset tulemust toetab täiendavalt bioloogiliselt usutava kontsentratsiooni ja toime vahelise sõltuvuse tuvastamine. Nagu eespool märgitud, ei tarvitse vitellogeniini sisalduse vähenemine olla tingitud üksnes endokriinsest mehhanismist, kuid positiivset tulemust tuleks üldiselt tõlgendada tõendina endokriinse mõju kohta *in vivo* ja seda tuleks selguse saamiseks tavaliselt täiendavalt uurida.

▼**M6**

KIRJANDUS

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences;67(1):121-30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼**M6**

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131.

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4: 87–98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M ja Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3): 774-81.

(22) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris.

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve ja G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. ENV/JM/-MONO(2006)18.

(28) OECD (2012). OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/-MONO(2012)22.

▼M6

1. liide

Lühendid ja mõisted

Kemikaal – aine või segu.

CV – variatsioonikordaja.

ELISA – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs.

Laadimisnorm – kalade märgmass vee ruumalaühiku kohta.

Loomkoormus – kalade arv vee ruumalaühiku kohta.

VTG (vitellogeniin) – fosfolipoglükoproteiin, mis on munakollases esineva valgu eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikides munemise teel paljunevate liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

HAS-telg – hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg.

MTC – maksimaalne talutav kontsentratsioon, mis on ligikaudu 10 % LC_{50} väärtusest.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M6

2. liide

Kalade endokriinsüsteemi mõjutavate kemikaalide sõeluuringu katse tingimused

1. Soovitatav liik	**Tüse tömpnina** (*Pimephales promelas*)	**Jaapani riisikala** (*Oryzias latipes*)	**Vöötdaanio** (*Danio rerio*)
2. Katse tüüp	Läbivooluga	Läbivooluga	Läbivooluga
3. Vee temperatuur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)
5. Valgustatus	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luksi (labori üldvalgustus)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luksi (labori üldvalgustus)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 luksi (labori üldvalgustus)
6. Valgustusperiood (koidu/hämariku üleminekuid võib korraldada, kuid neid ei peeta tingimata vajalikuks)	16 tundi valgust, 8 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 12–8 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 12–8 tundi pimedust
7. Laadimisnorm	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Katsekambri suurus	10 l (miinimum)	2 l (miinimum)	5 l (miinimum)
9. Katselahuse maht	8 l (miinimum)	1,5 l (miinimum)	4 l (miinimum)
10. Katselahuse kogu ruumala asendamine	Vähemalt 6 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas
11. Katseloomade vanus	Vt punkt 20	Vt punkt 20	Vt punkt 20
12. Täiskasvanud kala ligikaudne märgkaal (g)	Emased: 1,5 ± 20 % Isased: 2,5 ± 20 %	Emased: 0,35 ± 20 % Isased: 0,35 ± 20 %	Emased: 0,65 ± 20 % Isased: 0,4 ± 20 %
13. Kalade arv katsenõu kohta	6 (2 isaskala ja 4 emaskala)	10 (5 isaskala ja 5 emaskala)	10 (5 isaskala ja 5 emaskala)
14. Kontsentratsioonide arv	= 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)	= 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)	= 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)
15. Nõude arv ühe kemikaalikontsentratsiooni kohta	Vähemalt 4	Vähemalt 2	Vähemalt 2
16. Kalade arv ühe katses kasutatud kontsentratsiooni kohta	16 täiskasvanud emaslooma ja 8 isaslooma (4 emaslooma ja 2 isaslooma igas paralleelkatsenõus)	10 täiskasvanud emaslooma ja 10 isaslooma (5 emaslooma ja 5 isaslooma igas paralleelkatsenõus)	10 täiskasvanud emaslooma ja 10 isaslooma (5 emaslooma ja 5 isaslooma igas paralleelkatsenõus)
17. Söötmisrežiim	Elus või külmutatud soolase vee krevettide täiskasvanud või noorjärgus isendid 2–3 korda päevas (ad libitum), müügil olev kalasööt või nende kombinatsioon	Soolase vee krevettide noorjärgus isendid 2–3 korda päevas (ad libitum), müügil olev kalasööt või nende kombinatsioon	Soolase vee krevettide noorjärgus isendid 2–3 korda päevas (ad libitum), müügil olev kalasööt või nende kombinatsioon

▼**M6**

18. Aeratsioon	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist
19. Lahjendusvesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või deklooritud kraanivesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või deklooritud kraanivesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või deklooritud kraanivesi
20. Kokkupuute-eelne periood	Soovitatavalt 7 päeva	Soovitatavalt 7 päeva	Soovitatavalt 7 päeva
21. Kemikaaliga kokkupuute kestus	21 päeva	21 päeva	21 päeva
22. Bioloogilised näitajad	ellujäämine, käitumine, teisesed sootunnused, vitellogeniin	ellujäämine, käitumine, teisesed sootunnused, vitellogeniin	ellujäämine, käitumine, vitellogeniin
23. Katse nõuetekohasus	Lahustunud hapnikku > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur 25 ± 2 °C; kontrollrühma(de)s jäi ellu 90 % kaladest; katse ajal mõõdetud kontsentratsioonid vahemikus ± 20 % mõõdetud väärtuste keskväärtusest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapnikku > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur 24 ± 2 °C; kontrollrühma(de)s jäi ellu 90 % kaladest; katse ajal mõõdetud kontsentratsioonid vahemikus ± 20 % mõõdetud väärtuste keskväärtusest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapnikku > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur 26 ± 2 °C; kontrollrühma(de)s jäi ellu 90 % kaladest; katse ajal mõõdetud kontsentratsioonid vahemikus ± 20 % mõõdetud väärtuste keskväärtusest igal kontsentratsioonil

▼**M6**

3. liide

Mõned lahjendusvee nõutavad keemilised omadused

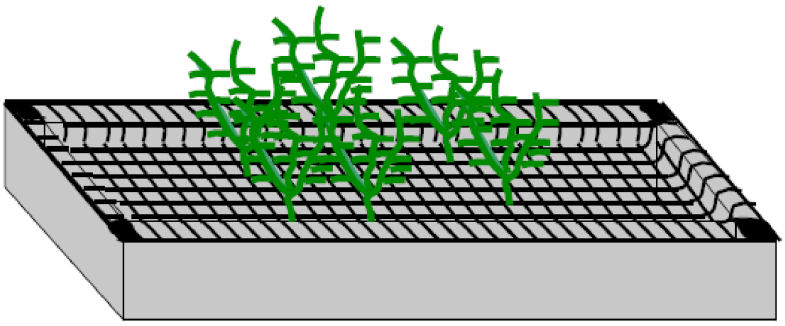
Koostisosa	Kontsentratsioon
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

▼**M6**

4.A liide

Vöötdaanio kudemissubstraat

Kudemisalus: üleni klaasist instrumendinõu, näiteks 22 × 15 × 5,5 cm (pikkus × laius × sügavus), kaetud eemaldatava roostevabast terastraadist võrega (võresilma suurus 2 mm). Võre peaks katma instrumendinõu valendiku allpool nõu äärt.



Võre peale tuleks kinnitada kudemissubstraat. See peaks moodustama struktuuri, millesse kalad saavad siseneda. Sobivad näiteks rohelisest plastikmaterjalist kunstlikud akvaariumitaimed (NB! tuleb arvestada uuritava kemikaali võimaliku adsorbeerumisega plastikmaterjalile). Plastikmaterjali tuleb leostada piisava koguse sooja veega piisavalt kaua, et hoida ära kemikaalide leostumine vette katse ajal. Klaasmaterjali kasutamisel tuleks tagada, et kalad ei saaks vigastusi ega peaks oma aktiivse tegevuse käigus taluma ruumikitsikust.

Vahemaa aluse ja kambri klaasseinte vahel peaks olema vähemalt 3 cm, et kudemine toimuks kindlalt vaagnale. Alusele koetud marjaterad langevad läbi võre ja need võib koguda 45–60 minutit pärast valgustuse sisselülitamist. Läbipaistvad marjaterad ei ole kleepuvad ja on külgvalguses kergesti loendatavad. Kui ühe nõu kohta kasutatakse viit emaskala, võib marjaterade arvu kuni 20 ühe päeva kohta pidada väikeseks, kuni 100 – keskmiseks ja üle 100 – rikkalikuks saagiseks. Kudemisalus tuleks eemaldada, marjaterad kokku koguda ja kudemisalus uuesti katsenõusse tagasi panna kas võimalikult hilja õhtul või väga vara hommikul. Aeg kudemisaluse tagasipanekuni ei tohiks olla pikem kui üks tund, sest vastasel juhul võib kudemissubstraadi olemasolu mõjutada kalu individuaalselt paarituma ja kudema ebatavalisel ajal. Kui olukord tingib kudemisaluse hilisema sissepanemise, tuleks seda teha vähemalt 9 tundi pärast valgustuse sisselülitamist. Sellisel hilisel kellaajal kudemist enam ei toimu.

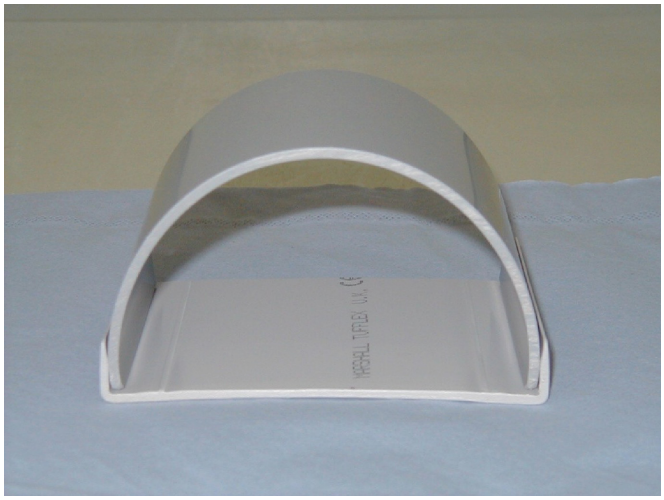
▼**M6**

4.B liide

Tüseda tömpnina kudemissubstraat

Igasse katsekambrisse pannakse kaks või kolm plastikust, klaasist, keraamilist või roostevabast terasest kudemisvõlvi ja kandikut (nt 80 mm pikkune hall kaarja ristlõikega rentslikivi, mis asub 130 mm pikkusel servadega kandikul) (vt joonis). Korralikult vanandatud polüvinüülkloriid- või keraamilised võlvid on tõendatult sobiv kudemissubstraat (Thorpe *et al*., 2007).

On soovitatav võlvid karestada, et parandada nakkuvust. Kandikud tuleks samuti varustada kaitsevõrega, et takistada kalade juurdepääsu koetud marjale, kui marjaterade tõhus nakkuvus kasutatava kudemissubstraadiga ei ole tõendatud.



Alus on tehtud nii, et see peaks kinni kõik marjaterad, mis ei nakku kudemisvõlvi pinnaga ja kukuvad sellepärast alusele (või marjaterad, mis on koetud otse lamedale plastikalusele). Kõiki kudemissubstraate tuleks enne kasutamist vähemalt 12 tundi lahjendusveega leostada.

VIIDE

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M6

5.A liide

Teiseste sootunnuste hindamine tüseda tõmpnina puhul endokriinse mõjuga kemikaalide tuvastamiseks

Ülevaade

Endokriinse mõjuga kemikaalide tuvastamiseks sobivad täiskasvanud tüseda tõmpnina potentsiaalselt olulised välistunnused hõlmavad järgmist: värvus (st hele/tume), värvumismuster (st vertikaalsete vöötide olemasolu või puudumine), kehakuju (st pea ja rinnaosa kuju, kõhu väljavenitatus) ja spetsiifilised teisesed sootunnused (st pulmarüüköbrukeste arv ja suurus, turjapadjandi ja kudemiselundi suurus).

Pulmarüü köbrukesed asuvad tüseda tõmpnina suguliselt aktiivse isaskala pea peal (turjapadjandil) ja on tavaliselt paigutatud bilateraalsümmeetriliselt (Jensen *et al*., 2001). Kontrollrühma emaskaladel ning noortel isas- ja emaskaladel köbrukesi ei ole (Jensen *et al*., 2001). Isaskala silmade ümber ja sõõrmete vahel võib olla kuni kaheksa eraldi köbrukest. Suurim arv köbrukesi ja suurimad köbrukesed asuvad kahel paralleelsel joonel otse sõõrmete all ja suu kohal. Paljudel kaladel on köbrukeste rühmad alalõua all; suule kõige lähemaid köbrukesi on tavaliselt üks paar, edasi kõhu poole võib neid olla kuni neli tükki. Köbrukeste tegelik arv on harva üle 30 (vahemik 18–28; Jensen *et al*., 2001). Suurem osa (arvuliselt) köbrukesi kujutab endast eraldi võrdlemisi ümmargust struktuuri, mille kõrgus on ligikaudu võrdne selle raadiusega. Enamikul suguliselt aktiivsetel isaskaladel on vähemalt mõned köbrukesed suurenenud ja esil, nii et neid ei ole võimalik eristada eraldi struktuurina.

Endokriinsüsteemi mõjutavate kemikaalide hulgas võivad teatavat liiki kemikaalid põhjustada teatavate vastassoo teiseste sootunnuste ebanormaalse ilmumise; näiteks sellised androgeeniretseptori agonistid nagu 17β-metüültestosteroon ja 17β-trenboloon võivad põhjustada emasel tüsedal tõmpninal pulmarüü köbrukeste ilmumise (Smith, 1974; Ankley *et al*., 2001, 2003), samal ajal kui östrogeeniretseptori agonistid võivad vähendada isaskaladel pulmarüü köbrukeste arvu või suurust (Miles-Richardson *et al*., 1999; Harries *et al*., 2000).

Allpool on esitatud tüseda tõmpnina pulmarüüköbrukeste kirjeldamise meetod, mida kasutatakse Minnesota osariigis Duluthis asuvas Ameerika Ühendriikide Keskkonnakaitseameti laboris. Konkreetsed tooted ja/või seadmed võib asendada võrreldavate kättesaadavate materjalidega.

Köbrukesi on kõige parem vaadelda valgustusega suurendusklaasi või valgustusega (3X) lahkamismikroskoobiga. Vaadelge kala selja poolt ja eest (peaga vaataja poole).

a) Pange kala väiksele Petri tassile (läbimõõt nt 100 mm), esiotsaga enda poole ja kõhuga allapoole. Seadke objektiivi fookus nii, et oleks võimalik vaadelda köbrukesi. Pöörake kala ettevaatlikult ja aeglaselt küljelt küljele, et tuvastada köbrukeste piirkonnad. Loendage ja hinnake köbrukesed.

b) Korrake vaatlust pea kõhupoolel, olles pannud kala Petri tassil selili esiotsaga enda poole.

c) Iga kala vaatlus tuleks viia lõpule kahe minutiga.

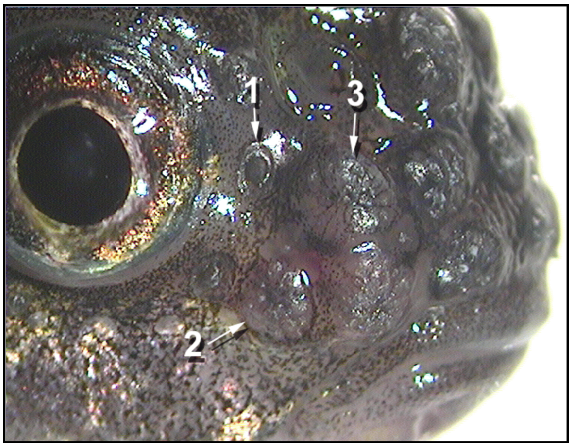
▼M6

Köbrukeste arv ja hindamine

Täiskasvanud tüseda tõmpnina köbrukeste olemasolu ja suuruse hindamiseks on määratletud kuus konkreetset ala. Olemasolevate köbrukeste asukoha ja arvu kaardistamiseks on välja töötatud vorm (vt käesoleva liite lõpus). Iga kala köbrukeste arv ja suurus registreeritakse kvantitatiivselt järgmiselt: 0 – puuduvad, 1– olemas, 2 – suurenenud ja 3 – tugevasti väljendunud (joonis 1).

0 punkti – köbrukesi ei ole. 1 punkt – köbrukesed on olemas, igal köbrukesel on üks kõrgeim punkt, mille kõrgus on ligikaudu võrdne raadiusega (diameetriga). 2 punkti – suurenenud köbrukesed, mille kude meenutab kujult tärni, millel on tavaliselt lai alus keskelt algavate radiaalsete vagudega. Köbrukeste tipp on sageli ebakorrapärasem, mõnikord võib olla mõnevõrra ümardunud. 3 punkti – selgelt väljendunud köbrukesed, on tavaliselt üsna suured ja ümmargused; struktuur on ebaselgem. Mõnikord on need köbrukesed kokku kasvanud ja moodustavad ühtse massi, mis hõlmab üht või mitut ala (B, C ja D, mida on kirjeldatud allpool). Värvumine ja muster on sarnased 2 punktile vastavate köbrukeste omale, kuid on mõnikord raskesti eristatavad. Selle süsteemi kasutamise korral on normaalsel kontrollrühma isasel, kelle köbrukeste arv on 18–20, üldine köbrukeste punktisumma < 50 (Jensen *et al*., 2001).

Joonis 1



Tegelik köbrukeste arv võib mõnel kalal olla suurem, kui on vormil (liide A) asjaomases hindamispiirkonnas lahtreid. Kui see on nii, võib täiendavad hinded märkida lahtri sisse, lahtrist paremale või vasakule. Vormist ei pea olema näha sümmeetriat. Täiendav meetod selliste köbrukeste kaardistamiseks, mis paiknevad piki suu horisontaaltasapinda vertikaalselt paaris või ühendatuna, on märkida kummagi köbrukese hinne samasse lahtrisse.

Kaardistamispiirkonnad on järgmised.

A – silmade ümber olevad köbrukesed. Kaardistatakse selja poolt kõhu poole piki silma eesmist äärt. Tavaliselt on kontrollrühma isaskaladel neid mitu, kontrollrühma emaskaladel neid ei ole; androgeenidega kokku puutunud emaskaladel esinevad need paaris (üks kummagi silma juures) või üksikult.

B – sõõrmete (meeleelundikanalite avade) vahel olevad köbrukesed. Kontrollrühma kõrgema hindega (2 – suurenenud või 3 – selgelt väljendunud) isaskaladel on need tavaliselt paaris. Kontrollrühma emaskaladel neid ei ole; androgeenidega kokku puutunud emaskaladel võib neid esineda ja need võivad olla teataval määral arenenud.

C – otse sõõrmetest eespool suuga paralleelselt asuvad köbrukesed. Suguküpsetel kontrollrühma isaskaladel on need tavaliselt suurenenud ja selgelt väljendunud. Vähem arenenud isaskaladel ja androgeeniga kokku puutunud emaskaladel on need olemas või suurenenud.

▼M6

D – köbrukesed, mis paiknevad paralleelselt piki suujoont. Üldiselt klassifitseeritakse need kontrollrühma isaskaladel „arenenuks”. Kontrollrühma emaskaladel neid ei ole, kuid androgeenidega kokku puutunud emaskaladel on need olemas.

E – alalõual suu kõrval paiknevad köbrukesed, tavaliselt väiksed ja paarikaupa. Kontrollrühma isaskaladel ning kemikaaliga kokku puutunud isaskaladel ja emaskaladel võivad need olla mitmesugused.

F – köbrukesed, mis paiknevad alast E kõhu pool. Tavaliselt väiksed ja paaris. Neid esineb kontrollrühma isastel ja androgeeniga kokku puutunud emaskaladel.

VIITED

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA,Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031-1038.

Köbrukeste hindamise vorm	**Numbriline hinnang**
ID _____	1 – on olemas
Kuupäev _____	2 – suurenenud
Üldsumma _____	3 – tugevasti väljendunud

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
				F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**			

▼M6

5.B liide

Teiseste sootunnuste hindamine jaapani riisikala puhul endokriinse mõjuga kemikaalide tuvastamiseks

Allpool on kirjeldatud papillaarjätkete (*) mõõtmist; nimetatud jätked on jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) teisesed sootunnused.

(*) Papillaarjätkeid esineb tavaliselt ainult täiskasvanud isaskaladel ja need asuvad pärakuuime tagumisest otsast lugedes teisel kuni seitsmendal või kaheksandal uimekiirel (joonised 1 ja 2). Mõnikord harva esineb selliseid jätkeid siiski ka pärakuuime tagumisest otsast lugedes esimesel uimekiirel. Käesolev standardne töökord hõlmab jätkete mõõtmist esimesel uimekiirel (uimekiire järjekorranumber saadakse siin loendamisega pärakuuime tagumisest otsast).

(1) Pärast maksa väljalõikamist (6. liide) pannakse rümp (pea ülespoole, saba allapoole) koonilisse katseklaasi, mis sisaldab ligikaudu 10 ml puhverdatud neutraalse pH-ga 10 % formaliinilahust. Kui sugunäärmed fikseeritakse mingi muu lahusega kui neutraalne puhverdatud 10 % formaliinilahus, tehke pärakuuime eesosa ja päraku vahelt žiletiteraga ristilõige läbi rümba, hoolitsedes selle eest, et gonopoorid ja sugunäärmed ise ei saaks viga (joonis 3). Pange kala keha peapoolne osa fikseerimislahusesse, et fikseerida sugunäärmed, ja sabapoolne osa neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse, nagu on kirjeldatud eespool.

(2) Pärast seda, kui kala keha on pandud 10 % neutraalsesse puhverdatud formaliini, võtke pärakuuime eesosast pintsettidega kinni ja tõmmake seda umbes 30 sekundit, et hoida pärakuuim lahti. Pärakuuimest kinnivõtmisel võtke pintsettide vahele mõned uimekiired uime eesosas ja jälgige, et papillaarjätked ei saaks kriimustada.

(3) Pärast seda, kui olete pärakuuime hoidnud lahti ligikaudu 30 sekundit, hoidke kala keha 10 % neutraalses puhverdatud formaliinis toatemperatuuril kuni papillaarjätkete mõõtmiseni (neid tuleks mõõta pärast vähemalt 24 tunni pikkust fikseerimist).

Mõõtmine

(1) Pärast kala keha fikseerimist 10 % neutraalses puhverdatud formaliinis vähemalt 24 tundi võtke kala rümp koonilisest katseklaasist ja pühkige formaliin filterpaberisse (või paberrätikusse).

(2) Pange kala kõhuga ülespoole. Seejärel lõigake väikeste lahkamiskääridega pärakuuim ettevaatlikult ära (parem on lõigata uim ära koos väikse koguse seda toestava koega).

(3) Võtke äralõigatud pärakuuime eesosast pintsettidega kinni ja pange see objektiklaasile, millel on mõni tilk vett. Seejärel katke pärakuuim katteklaasiga. Olge ettevaatlik, et pintsettidega pärakuuimest kinni võttes ei saaks papillaarjätked kriimustada.

(4) Loendage bioloogilise mikroskoobi abil (tavaline või invertmikroskoop) loenduri abil papillaarjätketega liigeseplaatide arv. Papillaarjätketeks loetakse väikest rühma jätkeid liigeseplaadi tagumisel serval. Kirjutage iga

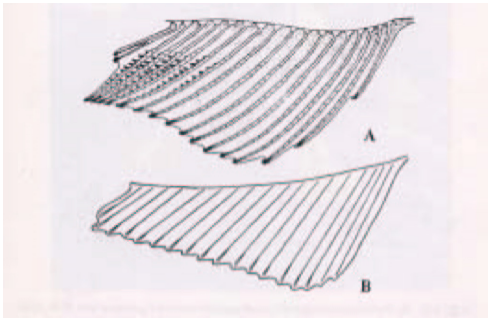
▼**M6**

uimekiire papillaarjätketega liigeseplaatide arv töölehele (nt esimene uimekiir: 0, teine uimekiir: 10, kolmas uimekiir: 12 jne) ning sisestage nende arvude summa iga kala kohta Exceli tabelisse. Vajaduse korral tehke pärakuuimest pilt ja loendage papillaarjätketega liigeseplaatide arv fotolt.

(5) Pärast mõõtmist pange pärakuuim koonilisse katseklaasi (1) ja hoidke see alles.

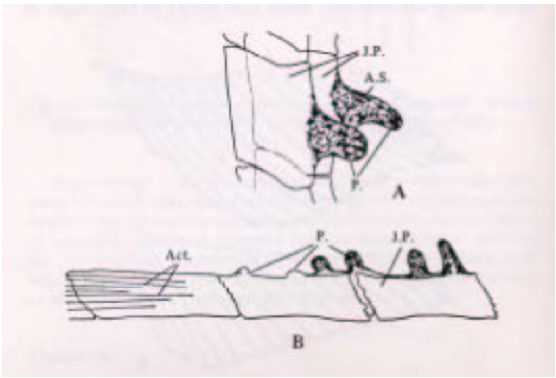
Joonis 1.

Pärakuuime kuju ja suuruse soolised erinevused. A – isaskala; B – emaskala. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Joonis 2.

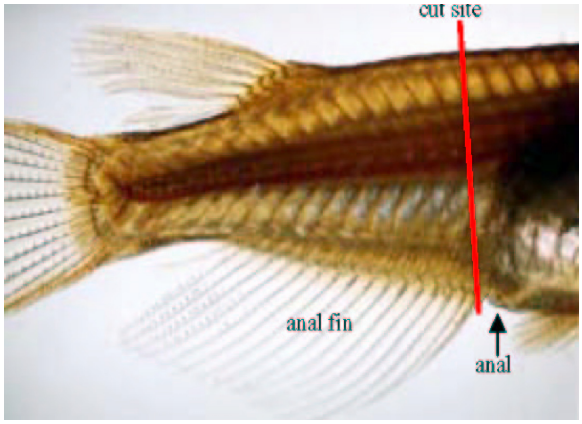
A. Jätked pärakuuime kiire liigeseplaatidel. J.P. (*joint plate*) – liigeseplaat; A.S. (*axial space*) – teljesuunaline vahekaugus; P. (*process*) – jätke. B. Uimekiire lõpuosa. Otsas on aktinotrihhiumid (Act.) (luuniidid). Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼M6

Joonis 3.

Kala keha, millel on näidatud lõikamiskoht, kui sugunäärmed fikseeritakse muus lahuses kui neutraalne puhverdatud 10 % formaliinilahus. Sellisel juhul lõigatakse keha pärakuuime eesosa ja päraku vahelt žiletiga läbi (punane joon); peapoolne osa pannakse sugunäärmete fikseerimiseks ette nähtud lahusesse ja sabapoolne osa neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse.



▼M6

6. liide

Vitellogeniini määramise puhul soovitatav proovi võtmise kord

Tuleks olla hoolikas, et hoida ära isas- ja emaskalade vitellogeniiniproovide ristsaastumist.

Meetod 1A. Tüseda tõmpnina vere võtmine sabaveenist/-arterist

Pärast tuimestamist lõigatakse sabavars skalpelliteraga osaliselt läbi ja veri kogutakse sabaveenist/-arterist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartorusse. Kui veri on kogutud, eraldatakse kiiresti plasma tsentrifuugimisega 3 minuti jooksul 15 000 *g* juures (või selle asemel 10 minuti jooksul 15 000 *g* ja 4 °C juures). Soovi korral võib määrata pärast tsentrifuugimist hematokriti. Plasmakogus eemaldatakse seejärel hematokriti määramiseks ette nähtud mikrokapillaartorust ja säilitatakse tsentrifuugitopsis 0,13 ühiku aprotiniini (proteaasiinhibiitor) juuresolekul – 80 °C juures, kuni on võimalik määrata vitellogeniin. Olenevalt tüseda tõmpnina suurusest (see sõltub soost), on ühest kalast kogutava plasma maht tavaliselt vahemikus 5–60 mikroliitrit (Jensen *et al.*, 2001).

Meetod 1B. Tüseda tõmpnina vere võtmine südamest

Teise võimalusena võib vere koguda südamepunktsiooniga, kasutades hepariniseeritud süstalt (1 000 ühikut hepariini ml kohta). Veri viiakse üle Eppendorfi katsutisse (mida hoitakse jää peal) ja seejärel tsentrifuugitakse (5 minutit, 7 000 *g*, toatemperatuuril). Plasma kantakse üle puhastesse Eppendorfi katsutitesse (alikvootidena, kui plasma maht seda võimaldab) ja külmutatakse viivitamata – 80 °C juures, kus seda säilitatakse kuni analüüsimiseni (Panter *et al*., 1998).

Meetod 2A. Jaapani riisikala maksa väljalõikamine

Katses kasutatavate kalade eemaldamine katsekambrist

(1) Katses kasutatavad kalad tuleks katsekambrist eemaldada väikse kahvaga. Olge hoolikas, et mitte pillata neid teise katsekambrisse.

(2) Üldiselt tuleks katses kasutatavad kalad eemaldada järgmises järjekorras: kontrollrühm, lahusti kontrollrühm (vajaduse korral), madalaima kontsentratsiooniga rühm, keskmise kontsentratsiooniga rühm, kõrgeima kontsentratsiooniga rühm ja positiivne kontroll. Lisaks tuleks ühest katsekambrist eemaldada kõigepealt kõik isaskalad ja seejärel allesjäänud emaskalad.

(3) Iga kala sugu tehakse kindlaks väliste teiseste sootunnuste järgi (nt pärakuuime kuju).

(4) Paigutage uuritavad kalad transpordimahutisse ja viige nad maksa väljalõikamiseks töölauale. Kontrollige katsekambri ja mahuti märgistuse õigsust ning veenduge, et katsekambrist võetud kalade arv ja katsekambrisse jäänud kalade arv vastavad eeldustele.

(5) Kui kalade sugu ei ole võimalik tuvastada välise vaatlusega, eemaldatakse katsekambrist kõik kalad. Sellisel juhul tuleks nende sugu määrata sugunäärmete või teiseste sootunnuste vaatlemisega stereomikroskoobi abil.

▼**M6**

Maksa väljalõikamine

(1) Viige kala väikse kahvaga transpordimahutist üle tuimastilahusesse.

(2) Pärast seda, kui kala on tuimestatud, viige ta tavaliste pintsettidega üle filterpaberile (või paberrätikule). Kala võtmisel haarake pintsettidega peast, et mitte murda saba.

(3) Pühkige vesi kala pealt filterpaberisse (või paberrätikusse).

(4) Pange kala kõhuga ülespoole. Seejärel tehke lahkamiskääridega väike lõige risti üle kõhupoolse kaelaosa ja kõhu keskosa.

(5) Pistke lahkamiskäärid väiksesse sisselõikesse ja lõigake kõht piki keskjoont lahti lõpusekattest saba pool asuvast punktist kuni päraku peapoolse servani. Olge ettevaatlik ja ärge torgake kääre liiga sügavale, et mitte vigastada maksa või sugunäärmeid.

(6) Järgmised toimingud tehke stereomikroskoobi all.

(7) Pange kala kõhuga ülespoole paberrätikule (või klaasist Petri tassile või objektiklaasile).

(8) Venitage kõhuõõne seinad laiali täppistööks ette nähtud pintsettidega ja võtke siseelundid välja. Vajaduse korral võib siseelundid välja võtta ka kõhuõõne ühe seina kõrvaldamisega.

(9) Teise paari täppispintsettide abil tooge esile maksa ja sapipõie ühenduskoht. Haarake kinni sapijuhast ja lõigake sapipõis ära. Olge ettevaatlik, et sapipõis ei läheks katki.

(10) Haarake kinni söögitorust ja lõigake seedekulgla maksast samal viisil lahti. Olge ettevaatlik, et seedekulgla sisu ei voolaks välja. Lõigake sabapoolne seedekulgla osa pärakust lahti ja eemaldage seedekulgla kõhuõõnest.

(11) Kärpige maksa kõrval olevat rasva ja muid kudesid. Olge ettevaatlik, et maks ei saaks kriimustada.

(12) Haarake täppispintsettidega maksa väratipiirkonnast ja tõstke maks kõhuõõnest välja.

(13) Pange maks objektiklaasile. Eemaldage vajaduse korral täppispintsettidega maksa pinnalt kogu rasv ja muu kude (nt kõhukelme).

(14) Mõõtke maksa mass elektroonilise analüütilise kaaluga, kasutades taarana 1,5 ml mikrokatsutit. Märkige maksa mass töölehele (täpsusega 0,1 mg). Kontrollige mikrokatsuti etiketil oleva identifitseerimisteabe õigsust.

(15) Sulgege maksa sisaldava mikrokatsuti kork. Pange mikrokatsuti jahutusega (või jääl olevasse) hoidjasse.

(16) Pärast ühe maksa väljalõikamist puhastage lahkamisriistad või asendage need puhastega.

▼M6

(17) Eemaldage eespool kirjeldatud viisil maks kõikidelt transpordimahutis olevatelt kaladelt.

(18) Pärast seda, kui maks on eemaldatud kõikidelt transpordimahutis olnud kaladelt (st kõigilt katsekambris olnud isas- ja emaskaladelt), pange kõik maksaproovid katsutihoidjasse, millel on identifitseerimisandmetega etikett, ja hoidke seda sügavkülmikus. Kui maksale hakatakse eeltöötlust tegema varsti pärast väljalõikamist, viiakse proovid järgmisele töölauale jahutusega katsutihoidjas (või jääl olevas hoidjas).

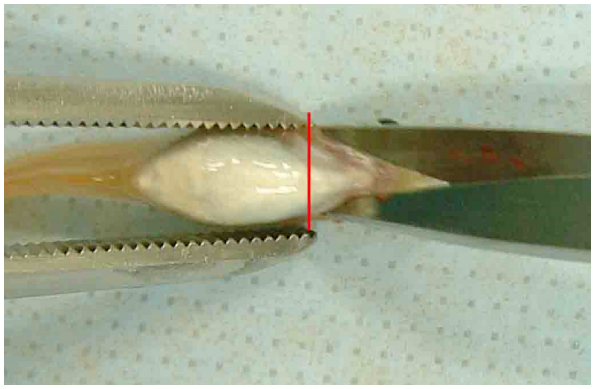
Pärast kaladelt maksa väljalõikamist on rümp valmis teiseste sootunnuste mõõtmiseks.

Proov

Säilitage maksaproove temperatuuril ≤ – 70 °C, kui neile ei hakata eeltöötlust tegema vahetult pärast väljalõikamist.

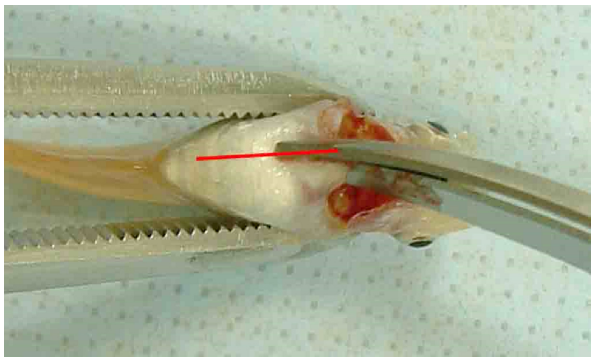
Joonis 1.

Lõige kääridega tehakse vahetult rinnauimedest eespool.



Joonis 2.

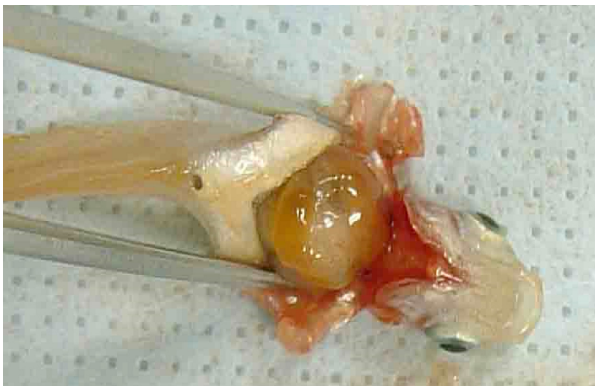
Kõhu keskjoont mööda lõigatakse kõht lahti punktini, mis asub umbes 2 mm pärakust pea pool.



▼M6

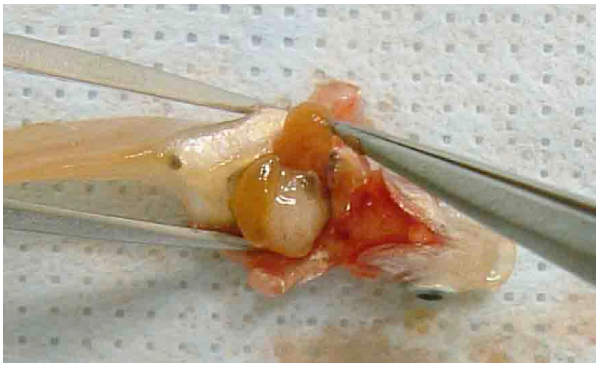
Joonis 3.

Kõhuseinad lükatakse pintsettidega laiali, et paljastada maks ja muud siseelundid. (Teise võimalusena võib kõhuseinad küljele lahti tõmmatult kinnitada nõeltega.)



Joonis 4.

Maks eraldatakse pintsettide abil ümbritsevatest kudedest.



Joonis 5.

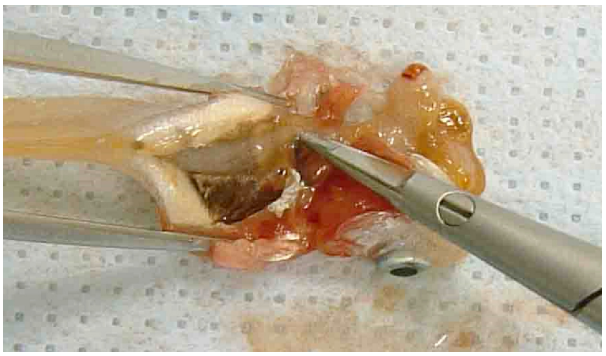
Sooled tõmmatakse ettevaatlikult pintsettidega eemale.



▼M6

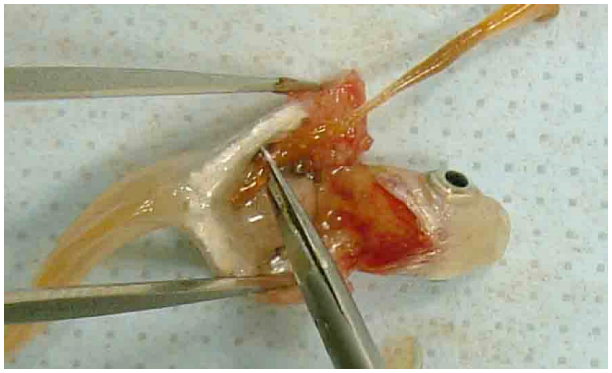
Joonis 6.

Soolestiku mõlemad otsad ja mesenteeriumimanused lõigatakse kääride abil lahti.



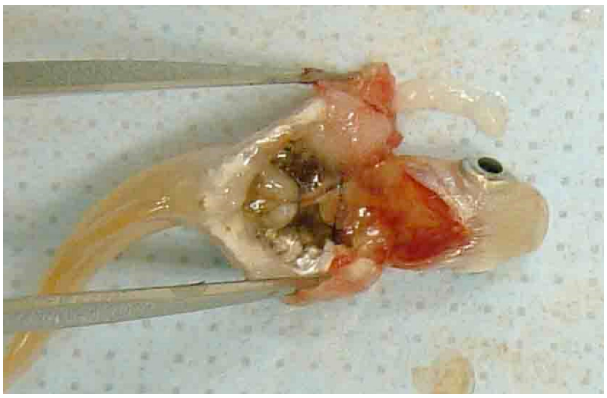
Joonis 7 (emaskala).

Emaskala puhul toimitakse samal viisil.



Joonis 8.

Lõpule viidud lahkamine.



Meetod 2B. Jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) maksa eeltöötlemine vitellogeniini määramiseks

Võtke ELISA komplektist homogeniseerimispuhver ja jahutage see purustatud jää abil maha (lahuse temperatuurini ≤ 4 °C). Kui kasutatakse EnBio ELISA süsteemi homogeniseerimispuhvrit, sulatage lahus toatemperatuuril ja siis jahutage pudelit purustatud jääs.

▼**M6**

Arvutage maksa jaoks vajalik homogeniseerimispuhvri maht, lähtudes maksa massist (lisage 50 µl homogeniseerimispuhvrit homogeniseeritava maksa mg kohta). Kui maksa mass on näiteks 4,5 mg, on vajalik homogeniseerimispuhvri kogus 225 µl. Koostage homogeniseerimispuhvri mahtude loetelu kõikide maksade jaoks.

Maksa ettevalmistamine eeltöötlemiseks

(1) Võtke 1,5 ml mikrokatsuti maksaga sügavkülmikust välja vahetult enne eeltöötlemist.

(2) Isaskalade maksa eeltöötlus peaks toimuma enne emaskalade maksa eeltöötlust, et hoida ära vitellogeniiniga saastumist. Peale selle peaks katserühmade kalade maksade eeltöötlemine toimuma järgmises järjekorras: kontrollrühm, lahusti kontrollrühm (vajaduse korral), madalaima kontsentratsiooniga rühm, keskmise kontsentratsiooniga rühm, kõrgeima kontsentratsiooniga rühm ja positiivne kontroll.

(3) Sügavkülmikust teataval ajahetkel võetavate maksaproove sisaldavate 1,5 ml mikrokatsutite arv ei tohiks ületada proovide arvu, mida saab samaaegselt tsentrifuugida.

(4) Paigutage maksa sisaldavad 1,5 ml mikrokatsutid proovi numbri järgi jääga hoidjasse (maksa üles sulatada ei ole vaja).

Eeltöötluse tegemine

1. Homogeniseerimispuhvri lisamine

(1) Vaadake homogeniseerimispuhvri mahtude loetelust, milline kogus puhvrit tuleb lisada konkreetsele maksaproovile, ja seadke mikropipett (mahuvahemikuga 100–1 000 µl) vajalikule mahule. Pange mikropipeti otsa puhas otsik.

(2) Võtke vajalik homogeniseerimispuhvri kogus reaktiivipudelist ja lisage 1,5 ml mikrokatsutisse, milles on maks.

(3) Lisage samal viisil homogeniseerimispuhver kõikidesse 1,5 ml mikrokatsutitesse, milles on maks. Mikropipeti otsikut ei ole seejuures vaja vahetada uue vastu. Kui aga otsik saastub või tekib saastumise kahtlus, tuleks otsik välja vahetada.

2. Maksa homogeniseerimine

(1) Pange mikrokatsutis homogeniseerimise seadmele uus nui.

(2) Viige nui 1,5 ml mikrokatsutisse. Hoidke mikrokatsutis homogeniseerimise seadet nii, et maks oleks pressitud nuia ja 1,5 ml mikrokatsuti seina vahele.

(3) Laske homogenisaatoril mikrokatsutis töötada 10–20 sekundit. Jahutage homogeniseerimise ajal 1,5 ml mikrokatsutit purustatud jääga.

(4) Tõstke nui 1,5 ml mikrokatsutist välja ja jätke segu seisma umbes 10 sekundiks. Seejärel vaadelge suspensiooni.

(5) Kui suspensioonis on näha maksatükikesi, korrake toiminguid (3) ja (4), et saada rahuldav maksahomogenaat.

▼**M6**

(6) Jahutage maksasuspensiooni jääga katsutihoidjas kuni tsentrifuugimiseni.

(7) Vahetage homogenisaatori nui uue vastu enne iga homogeniseerimist.

(8) Homogeniseerige kõik maksad homogeniseerimispuhvriga vastavalt eespool kirjeldatud korrale.

3. Homogeniseeritud maksasuspensiooni tsentrifuugimine

(1) Kontrollige, et jahutatud tsentrifuugikambri temperatuur oleks ≤ 5 °C.

(2) Pange 1,5 ml mikrokatsutid homogeniseeritud maksa suspensiooniga jahutatud tsentrifuugi (vajaduse korral tasakaalustage tsentrifuug).

(3) Tsentrifuugige homogeniseeritud maksa suspensiooni 13 000 *g* juures 10 minutit temperatuuril ≤ 5 °C. Kui supernatant eraldub korralikult, võite tsentrifugaaljõudu ja aega vastavalt vajadusele muuta.

(4) Pärast tsentrifuugimist kontrollige, et supernatant on piisaval määral eraldunud (pinnal – lipiidid, keskel – supernatant, alumine kiht – maksakude). Kui eraldumine ei ole piisav, tsentrifuugitakse suspensiooni uuesti samades tingimustes.

(5) Võtke kõik proovid jahutatud tsentrifuugist ja pange need proovi numbri järgi jääga katsutihoidjasse. Olge ettevaatlik, et tsentrifuugimisega eraldatud kihte mitte uuesti suspendeerida.

4. Supernatandi kogumine

(1) Pange neli supernatandi säilitamiseks ette nähtud 0,5 ml mikrokatsutit katsutihoidjasse.

(2) Võtke mikropipetiga 30 µl supernatanti (keskmine kiht) ja viige see ühte 0,5 ml mikrokatsutitest. Olge ettevaatlik, et mitte võtta lipiide pinnalt ega maksakudet alumisest kihist.

(3) Võtke veel supernatanti ja pange see eespool kirjeldatud viisil veel kahte 0,5 ml mikrokatsutisse.

(4) Võtke mikropipetiga ülejäänud supernatant (võimaluse korral ≥ 100 µl). Seejärel pange see supernatant viimasesse 0,5 ml mikrokatsutisse. Olge ettevaatlik, et mitte võtta pinnalt lipiide ega alumisest kihist maksakudet.

(5) Sulgege 0,5 ml mikrokatsuti kork ja kirjutage supernatandi maht etiketile. Seejärel jahutage mikrokatsutid jääga katsutihoidjas viivitamata maha.

(6) Vahetage mikropipeti otsik uue vastu iga kord enne uue supernatandi võtmist. Kui otsiku külge kleepub suur kogus lipiide, vahetage otsik kohe, et hoida ära maksaekstrakti saastumist rasvaga.

(7) Pange kogu tsentrifuugitud supernatant nelja 0,5 ml mikrokatsutisse vastavalt eespool kirjeldatud korrale.

▼M6

(8) Pärast supernatandi viimist 0,5 ml mikrokatsutitesse pange need kõik identifitseerimisetiketiga katsutihoidjasse ja seejärel külmutage need kohe sügavkülmikus. Kui vitellogeniini kontsentratsioonid mõõdetakse kohe pärast eeltöötlemist, hoidke üks 30 µl supernatanti sisaldav 0,5 ml mikrokatsuti jahutatult katsutihoidjas ja viige see töölauale, kus tehakse ELISA. Sellisel juhul pange ülejäänud mikrokatsutid katsutihoidjatesse ja külmutage need sügavkülmikus.

(9) Pärast supernatandi võtmist visake ülejäänud materjal ära.

Proovi säilitamine

Säilitage maksahomogenaadi supernatandiga 0,5 ml mikrokatsuteid temperatuuril ≤ – 70 °C, kuni neid kasutatakse ELISA tegemiseks.

Meetod 3A. Vöötdaanio vere võtmine sabaveenist/-arterist

Kohe pärast tuimestamist lõigatakse sabavars risti läbi ja veri kogutakse sabaveenist/-arterist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartorusse. Vere kogus on vahemikus 5–15 µl, sõltuvalt kala suurusest. Mikrokapillaartorusse lisatakse võrdne kogus aprotiniiniga puhvrit (6 µg/ml fosfaatpuhvrilisandiga soolalahuses (PBS)) ja plasma eraldatakse verest tsentrifuugimise teel (5 minutit, 600 *g*). Plasma kogutakse katseklaasidesse ja säilitatakse temperatuuril – 20 °C kuni vitellogeniini või muude huvipakkuvate valkude määramiseni.

Meetod 3B. Vöötdaanio vere võtmine südamepunktsiooniga

Vere hüübimise ja valkude lagunemise takistamiseks võetakse proovid fosfaatpuhvrilisandiga soolalahusesse (PBS), mis sisaldab hepariini (1 000 ühikut/ml) ja proteaaside inhibiitorit aprotiniini (2 trüpsiiniinhibiitori ühikut (TIU) / ml). Puhvrikomponentidena soovitatakse kasutada hepariini ammooniumsoola ja lüofiliseeritud aprotiniini. Vereproovi võtmiseks soovitatakse kasutada 1 ml süstalt, millel on fikseeritud peen nõel (nt Braun Omnikan-F). Süstlasse tuleks eelnevalt võtta puhverlahust (ligikaudu 100 µl), et iga kala väike verekogus süstlast puhverlahusega täielikult kätte saada. Vereproovid võetakse südamepunktsiooniga. Kõigepealt tuleks kala tuimestada MS-222-ga (100 mg/l). Nõuetekohane tuimestus võimaldab kasutajal eristada vöötdaanio südamelööke. Südame punkteerimisel hoidke süstla kolbi nõrga tõmbe all. Kogutava vere maht on vahemikus 20–40 mikroliitrit. Pärast südamepunktsiooni tuleks vere ja puhvri segu panna katsutisse. Plasma eraldatakse verest tsentrifuugimise teel (20 minutit, 5 000 g) ja seda tuleks säilitada – 80 °C juures kuni analüüsi tegemiseni.

Meetod 3C. Standardne töökord vöötdaanio pea ja saba homogeniseerimiseks

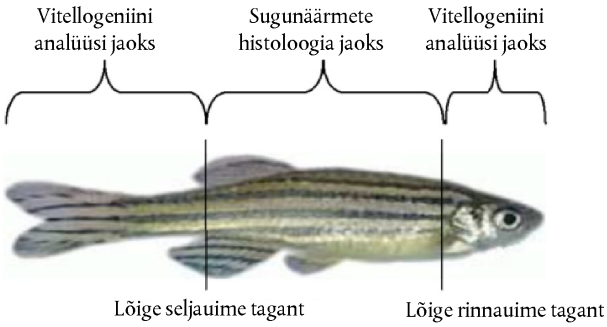
(1) Kalad tuimestatakse ja surmatakse humaansel viisil kooskõlas katsemeetodi kirjeldusega.

(2) Kala pea ja saba lõigatakse ära nii, nagu on näidatud joonisel 1.

Oluline märkus: kõik lõikeriistad ja lõikelaud tuleks enne iga kala lõikamist loputada ja korralikult puhastada (näiteks 96 % etanooliga), et hoida ära kemikaaliga mitte kokku puutunud isaskalade saastumist emaskalade ja kemikaaliga kokku puutunud isaskalade vitellogeniiniga.

▼**M6**

Joonis 1



(3) Iga kala pea ja saba pannakse kokku ja nende summaarne mass mõõdetakse milligrammi täpsusega.

(4) Pärast kaalumist pannakse need kehaosad sobivasse nõusse (nt 1,5 ml Eppendorfi katsuti) ja külmutatakse – 80 °C juures kuni homogeniseerimiseni või homogeniseeritakse kohe jää peal kahe plastikvarda abil. (Võib kasutada ka muid meetodeid, kui homogeniseerimine toimub jää peal ja saadakse homogeenne mass.) Oluline märkus: katsutid peavad olema korralikult nummerdatud, nii et kala pea ja saba on kokkuviidavad vastava kehatükiga, mida kasutatakse sugunäärmete histoloogiliseks uurimiseks.

(5) Pärast ühtlase massi saavutamist lisatakse koemassiga võrreldes neljakordne kogus jääkülma homogeniseerimispuhvrit (*). Jätkatakse töötamist varrastega, kuni segu on homogeenne. Oluline märkus: iga kala puhul kasutatakse uusi vardaid.

(6) Proovid pannakse jääle kuni tsentrifuugimiseni 4 °C ja 50 000 *g* juures 30 minuti jooksul.

(7) Pipetiga pannakse vähemalt kahte katsutisse 20 µl supernatanti; pipeti ots viiakse allapoole pindmist rasvakihti ja supernatant eemaldatakse nii, et rasva- ja sademefraktsioon kaasa ei tuleks.

(8) Katsuteid säilitatakse temperatuuril – 80 °C kuni kasutamiseni.

(*) **Homogeniseerimispuhver:**

— 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % proteaasiinhibiitorite segu (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaasiinhibiitorite segu;

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), näiteks Taani firmalt Bie & Berntsen;

— proteaasiinhibiitorite segu: Sigma (imetajate kudede jaoks), tootenumber P 8340.

— *Märkus:* homogeniseerimispuhver peaks olema valmistatud samal päeval. Pange kasutamise ajaks jää peale.

▼M6

7. liide

Vitellogeniiniga rikastatud proovid ja eri analüüsides kasutatav vitellogeniini võrdlusstandard

Igal vitellogeniinianalüüsi tegemise päeval mõõdetakse ka rikastatud proovi, mis on valmistatud eri katsetes kasutatava võrdlusstandardiga. Vitellogeniin, millest valmistatakse eri katsetes kasutatav võrdlusstandard, peab olema muust partiist kui see, mida kasutatakse katse kaliibrimisstandardite tegemiseks.

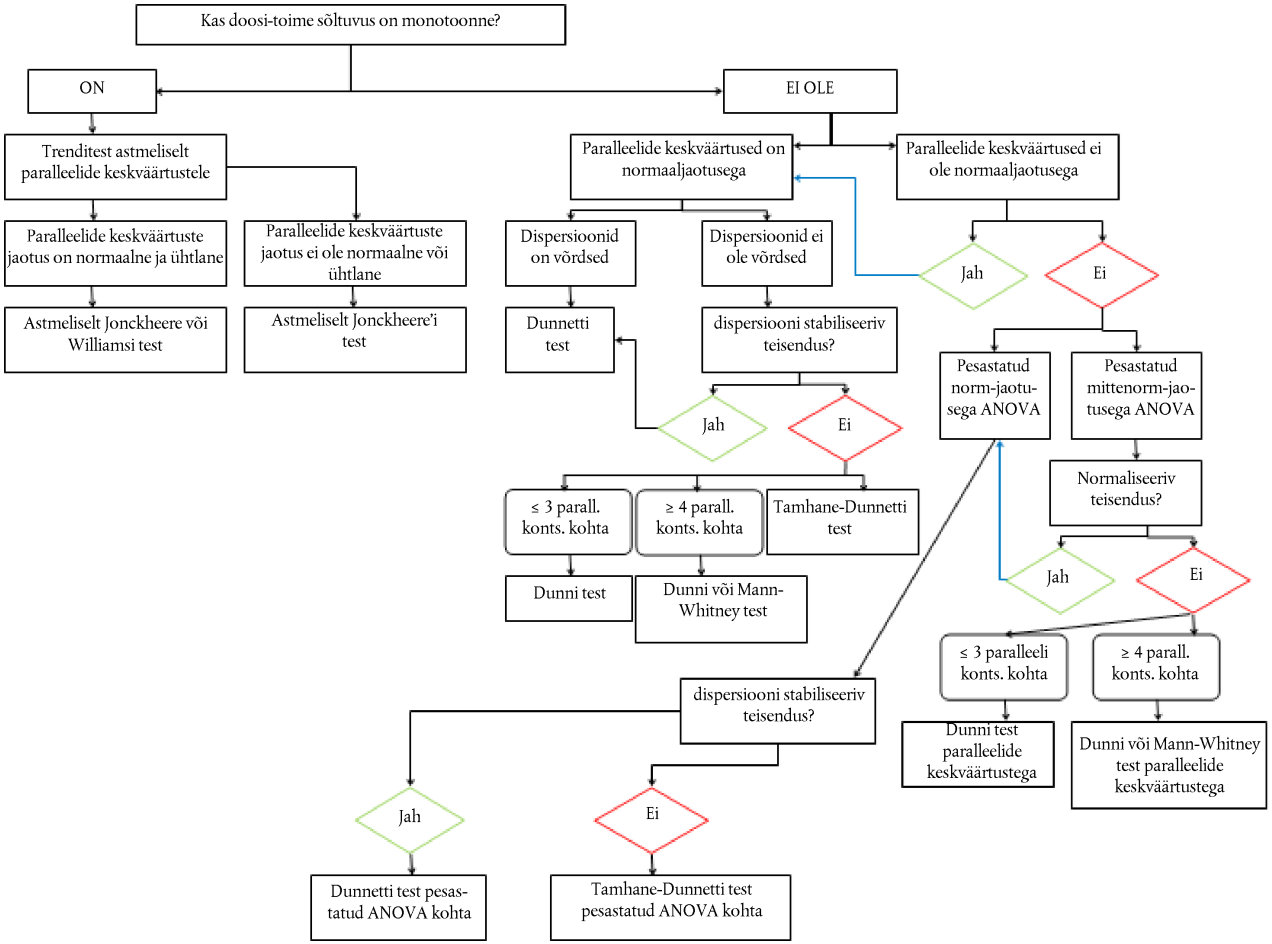
Rikastud proov valmistatakse teadaoleva koguse võrdlusstandardi lisamisega kontrollrühma isaskalade plasmaproovile. Proovi rikastatakse nii, et saavutatakse vitellogeniini kontsentratsioon, mis on 10–100 korda suurem kui kontrollrühma isaskalade plasmas olev eeldatav kontsentratsioon. Kontrollrühma isaskalade plasma, mida rikastatakse, võib pärineda kas ühelt või mitmelt kalalt.

Kontrollrühma isaskalade rikastamata plasma osaproovi analüüsitakse vähemalt kahes paralleelaugus. Rikastatud plasmat analüüsitakse samuti vähemalt kahes paralleelaugus. Eeldatava kontsentratsiooni määramiseks liidetakse kontrollrühma isaskalade kahes rikastamata proovis sisalduva vitellogeniinikoguse keskväärtusele rikastamisel lisatud arvutuslik vitellogeniinikogus. Eeldatava kontsentratsiooni ja mõõdetud kontsentratsiooni suhtarv esitatakse koos samal päeval tehtud määramiste tulemustega.

▼M6

8. liide

Statistilise analüüsi otsustamisskeem



▼M6

C.38. KAHEPAIKSETE METAMORFOOSI KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 231 (2009). Vajadus töötada välja ja valideerida katse, mille abil saaks välja selgitada kemikaale, mis avaldavad mõju selgroogsete loomade kilpnäärmesüsteemile, tuleneb kartustest, et kemikaalid võivad juba keskkonnas oleva kontsentratsiooni juures avaldada kahjulikku mõju nii inimestele kui ka elusloodusele. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja kemikaalid, mis võivad kahjustada endokriinsüsteemi, ja teha kindlaks nende mõju. Üks tegevussuund oli töötada välja katsejuhend sõeluuringu tegemiseks, millega selgitatakse välja kemikaale, mis mõjutavad selgroogsete kilpnäärmesüsteemi. Tehti ettepanek tõhustada selleks suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevast uuringut närilistel (vt käesoleva lisa peatükk B.7) ja kahepaiksete metamorfoosi katset (*Amphibian Metamorphosis Assay*, AMA). Tõhustatud katsemeetod B.7 on läbinud valideerimise ja läbivaadatud katsemeetod on avaldatud. Kahepaiksete metamorfoosi katse on läbinud ulatusliku valideerimisprogrammi, mis hõlmas laborisiseseid ja laboritevahelisi uuringuid, millega tõendati katsemeetodi asjakohasust ja usaldusväärsust (1, 2). Seejärel läbis katse valideerimine vastastikuse hindamise sõltumatute ekspertide rühma poolt (3). Käesolev katsemeetod põhineb kogemustel, mis on saadud kilpnääret mõjutavate kemikaalide väljaselgitamiseks kasutatava meetodi valideerimisel, ning mujal OECD riikides tehtud töödel.

KATSE PÕHIMÕTE

2. Kahepaiksete metamorfoosi katse on sõeluuring, mis on ette nähtud selliste kemikaalide empiiriliseks kindlakstegemiseks, mis võivad takistada hüpotalamuse-ajuripatsi-kilpnäärme telje normaalset talitlust. Nimetatud katse kujutab endast üldistatud selgroogsete mudelit, kuivõrd see põhineb hüpotalamuse-ajuripatsi-kilpnäärme telje evolutsioonis konserveerunud struktuuridel ja funktsioonidel. See on oluline katse, kuna kahepaiksete metamorfoos on hästi uuritud ja kilpnäärmest sõltuv protsess, mis reageerib hüpotalamuse-ajuripatsi-kilpnäärme telge mõjutavatele kemikaalidele ja on ainus olemasolev meetod, millega saab uurida kilpnäärme aktiivsust looma morfoloogilise arengu käigus.

3. Katse üldise korralduse kohaselt viiakse *Xenopus laevis*'e kullesed arengustaadiumis 51 kokkupuutesse uuritava kemikaali vähemalt kolme eri kontsentratsiooniga ja kontrolliks ka lahjendusveega 21 päeva jooksul. Iga kokkupuuteuuring tehakse nelja paralleelkatsega. Kulleste tihedus katse alustamise ajal on 20 kullest katseakvaariumi kohta iga katserühma puhul. Uuritavad näitajad on tagajäseme pikkus, vahemaa ninamikust kuni pärakuavani (*snout to vent length*, SVL), arengustaadium, märgkaal, kilpnäärme histoloogia ja igapäevased tähelepanekud surmajuhtumite kohta.

MEETODI KIRJELDUS

Katses kasutatav liik

4. *Xenopus laevis*'t kasvatatakse plaaniliselt kogu maailma laborites ja see liik on kaubanduslikult kergesti kättesaadav. Selle liigi esindajateesindajate paljunemist on kerge aastaringselt esile kutsuda inimese kooriongonadotropiini süstimisega ja saadavaid vastseid võib regulaarselt kasvatada valitud arengustaadiumideni suurtes kogustes, mis võimaldab kasutada

▼M6

konkreetse arengujärguga seotud katse-eeskirja. Katses on soovitatav kasutada vastseid, kes on saadud samas laboris elavatelt täiskasvanud konnadelt. Vähem soovitatava asendusvõimalusena võib katse tegemist kavandav labor tellida mune või looteid ja lasta neil aklimatiseeruda; vastse-järkudes noorloomade tellimine katses kasutamiseks on lubamatu.

Seadmed ja vajalikud vahendid

5. Käesoleva katse tegemiseks on vaja järgmisi seadmeid ja vahendeid:

a) süsteem kemikaaliga kokkupuutesse viimiseks (vt kirjeldus allpool);

b) klaasist või roostevabast terasest akvaariumid (vt kirjeldus allpool);

c) paljundusnõud;

d) temperatuuri kontrollimise seade (nt jahutid või kütteseadmed, mis on reguleeritavad temperatuurile 22 ± 1 °C);

e) termomeeter;

f) binokulaarne lahkamismikroskoop;

g) mikroskoobiga ühendatav digitaalne fotoaparaat vähemalt 4-megapikslise lahutusvõimega;

h) kujutise digiteerimise tarkvara;

i) Petri tass (nt 100 × 15 mm) või võrreldava suurusega läbipaistvast plastikust kamber;

j) analüütiline kaal, millega on võimalik kaaluda kolme kümnendkoha (mg) täpsusega;

k) lahustunud hapniku kontsentratsiooni mõõtja;

l) pH-meeter;

m) valgustatuse mõõtja, mis võimaldab mõõta tulemust luksides;

n) mitmesugused klaasist laborinõud ja muud vahendid;

o) reguleeritavad pipetid (10–5 000 µl) või valik muid sama suurusvahemiku pipette;

p) uuritav kemikaal piisavas koguses uuringu läbiviimiseks, eelistatavalt ühest partiist;

q) analüüsivahendid, mis sobivad uuritava kemikaali määramiseks või leping analüüsiteenuste saamiseks.

Kemikaali uuritavus

6. Kahepaiksete metamorfoosi katse põhineb veekaudse kokkupuute eeskirjal, mille puhul uuritav kemikaal viiakse katsekambritesse läbivoolusüsteemi kaudu. Läbivoolumeetoditega saab aga uurida ainult piiratud hulka kemikaalitüüpe, ja uuritavus oleneb kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Seepärast tuleb enne käesoleva eeskirja kasutamist koguda kemikaali kohta teavet, mis on vajalik tema uuritavuse kindlakstegemiseks, ning tutvuda OECD juhendiga, milles käsitletakse veekeskkonna jaoks mürgisuse määramist uurimisel raskusi valmistavate ainete ja segude (4) puhul.

▼M6

Omadused, mis näitavad, et kemikaali mõju veesüsteemides võib olla raske uurida: kõrge oktanooli-vee jaotuskoefitsient (log K_{ow}), suur lenduvus, kalduvus hüdrolüüsiks, kalduvus fotolüüsiks tavalistes labori valgustustingimustes. Ka muud tegurid võivad olla asjakohased uuritavuse seisukohast ja neid tuleks määrata iga juhtumi puhul eraldi. Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik korralikult uurida läbivoolukatse süsteemis, võib kasutada staatilist uuendussüsteemi. Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik uurida kummagi süsteemi abil, siis tuleb loobuda selle uurimisest käesoleva eeskirja järgi.

Kokkupuutesüsteem

7. Võimaluse korral tuleb eelistada läbivooluga lahjendussüsteemi staatilise uuendussüsteemi ees. Kui uuritava kemikaali füüsikalised või keemilised omadused ei sobi läbivooluga lahjendussüsteemi kasutamiseks, võib selle asemel kasutada muud kemikaaliga kokkupuute süsteemi (nt staatilist uuendussüsteemi). Süsteemi kõik veega kokkupuutuvad osad peaksid olema klaasist, roostevabast terasest või polütetrafluoroetüleenist. Kasutada võib ka sobivaid plastikuid, kui need ei kahjusta tulemuste usaldusväärsust. Kokkupuutenõudeks peaksid olema klaasist või roostevabast terasest akvaariumid, mis on varustatud püsttorudega, mis tagavad nõus oleva vee ligikaudse ruumala vahemikus 4,0–10,0 liitrit ja minimaalse veesügavuse 10–15 cm. Süsteem peaks võimaldama kasutada kõiki kokkupuutekontsentratsioone ja teha kontrollkatset, nelja paralleelkatsega iga doosirühma kohta. Voolukiirus igas nõus peaks olema konstantne, nii et oleks võimalik säilitada bioloogilisi tingimusi kui ka kemikaaliga kokkupuute tingimusi (nt 25 ml/min). Kokkupuutenõud tuleks kokkupuutesüsteemis kohtadele paigutada juhuvaliku alusel, et vähendada asukoha, sealhulgas temperatuuri, valgustuse intensiivsuse jm väikeste erinevuste võimalikku mõju. Kasutada tuleks luminofoorlampe ning valgustusperioodi 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust; valguse intensiivsus vee pinnal peab olema 600–2 000 luksi (luumen/m^2). Igas katsenõus tuleks vesi hoida temperatuuril 22 ± 1 °C, pH vahemikus 6,5–8,5 ning lahustunud hapniku (DO) kontsentratsioon > 3,5 mg/l (> 40 % õhu küllastuskontsentratsioonist). Vee temperatuuri, pH-d ja lahustunud hapniku kontsentratsiooni tuleks mõõta vähemalt kord nädalas; temperatuuri tuleks eelistatavalt mõõta pidevalt vähemalt ühes katseanumas. 1. liites on kirjeldatud katsetingimusi, mida tuleks kasutada käesoleva eeskirja järgi katse tegemisel. Lisateavet läbivooluga kokkupuutesüsteemi ja/või staatilise uuendussüsteemi koostamise kohta võib leida katsejuhendis *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (5) ja üldistes veekeskkonna suhtes mürgisuse määramise juhendites.

Vee kvaliteet

8. Kasutada võib iga kohapeal kättesaadavat vett (nt allikavesi või aktiivsöel filtritud kraanivesi), mis võimaldab *X. laevis*'e kulleste normaalset kasvu ja arengut. Kuna kohaliku vee kvaliteet võib olenevalt asukohast oluliselt erineda, tuleb teha vee kvaliteedi analüüs, eriti juhul, kui puuduvad varasemad andmed selle vee kasutamise kohta *Xenopus*'e kasvatamiseks. Erilist tähelepanu tuleks pöörata sellele, et vesi ei sisaldaks vaske, kloori ja kloramiini, mis on konnade ja kulleste jaoks mürgised. Lisaks soovitatakse vees analüüsida (joogivee desinfitseerimise kõrvalsaaduste) fluoriidi, perkloraadi ja kloraadi sisaldust, kuna kõik need anioonid on kilpnäärmes

▼M6

joodi transportiva süsteemi substraadid ja nendest ükskõik millise kõrgem sisaldus muudab uuringu tulemuse mitte usaldatavaks. Analüüs tuleks teha enne katse algust ja katse ajal ei tohiks vees neid anioone tavaliselt olla.

Jodiidi kontsentratsioon katsevees

9. Selleks et kilpnääre saaks sünteesida kilpnäärmehormoone, peab vastsele olema vee ja sööda kaudu kättesaadav piisav kogus jodiidi. Praegu ei ole empiirilisi suuniseid minimaalse jodiidi kontsentratsiooni kohta. Siiski võib jodiidi kättesaadavus mõjutada kilpnäärmesüsteemi reageerimisvõimet kilpnääret aktiveerivatele teguritele ja on teada, et see mõjutab kilpnäärme baasaktiivsust; see aspekt väärib tähelepanu kilpnäärme histopatoloogia alaste tulemuste tõlgendamisel. Seepärast tuleb katsearuandes ära märkida katseks kasutatud vees mõõdetud jodiidi kontsentratsioonid. Olemasolevate valideerimisuuringute tulemuste põhjal on käesolev eeskiri andnud häid tulemusi, kui jodiidi (I^-) sisaldus katseks kasutatud vees oli vahemikus 0,5–10 μg/l. Ideaaljuhul peaks jodiidi kontsentratsioon katseks kasutatud vees olema vähemalt 0,5 μg/l. Kui katseks kasutatav vesi saadakse deioniseeritud veest kunstlikult, tuleks sellele lisada jodiidi minimaalses kontsentratsioonis 0,5 μg/l. Katsearuandesse tuleks märkida joodi või muude soolade täiendav lisamine katseks kasutatud vette.

Loomade pidamine

Täiskasvanute hooldus ja järglaste saamine

10. Täiskasvanud konnade hooldamine ja nendelt järglaste saamine toimub vastavalt üldistele suunistele ja lugeja leiab selle kohta üksikasjalikuma teabe konnaloote teratogeneesi katse (*Frog Embryo Teratogenesis Assay*, FETAX) juhendist (6). Sellistes üldistes suunistes on esitatud näide sobivate hooldamis- ja järglaste saamise meetodite kohta, kuid ranget kinnipidamist neist suunistest ei nõuta. Paljunemise algatamiseks süstitakse kolmele kuni viiele täiskasvanud emas- ja isaslooma paarile inimese kooriongonadotropiini (hCG). Emas- ja isasisenditele süstitakse vastavalt ligikaudu 800–1 000 RÜd ja 600–800 RÜd hCG-d, mis on lahustatud 0,6–0,9 % soolalahuses. Paljunduspaare hoitakse suurtes nõudes, häirimata ja püsivates tingimustes, et esile kutsuda kopulatsiooni (ampleks). Igas paljundusnõus peaks olema roostevabast terasest või plastikvõrgust topeltpõhi, läbi mille munamassid kukuvad nõu põhjale. Hilisel pärastlõunal süstitud konnad koevad enamiku mune järgmise päeva hommikupoolikul. Kui on koetud ja viljastatud piisav kogus mune, eemaldatakse täiskasvanud isendid paljundusnõust.

Vastsete eest hoolitsemine ja vastsete valimine

11. Pärast täiskasvanud isendite eemaldamist paljundusnõust kogutakse munad ja hinnatakse nende eluvõimet, kasutades esindavat loodete valikut kõikidest paljundusnõudest. Parim kudu (parimad kudud) (soovitatakse valida 2-3 kudu nende kvaliteedi hindamiseks) valitakse välja loodete elujõulisuse ja piisava arvu (vähemalt 1 500 loodet) põhjal ja tuleks säilitada. Kõik uuringus kasutatavad organismid peavad pärinema ühest kudemissündmusest (s.o kudusid ei tohi kokku segada). Looted viiakse üle suurele lamedale vaagnale või pannile ning kõik ilmselt surnud või ebanormaalsed munad (vt määratlus (5)) kõrvaldatakse pipeti või silmapipeti abil. Kõigi kolme kudu terved looted viiakse üle kolme eraldi koorumisnõusse. Neli päeva pärast koorumisnõusse üleviimist valitakse välja parim kudu, arvestades elujõulisust ja koorumise edukust, ning vastsed kantakse üle kasvatusnõudesse, mida võetakse vajalik arv ja milles temperatuur on 22 ± 1 °C.

▼**M6**

Lisaks võetakse veel täiendavaid vastseid lisanõudesse, et kasutada neid asendusmaterjalina, kui kasvatusnõudes peaks osa vastseid esimese nädala jooksul surema. Selliselt toimides hoitakse isendite tihedust ühtlasena ja sellega vähendatakse ühe kudu kohordis esinevaid arenguerinevusi. Kõiki kasvatusnõusid tuleb sifoonimisega iga päev puhastada. Ettevaatusabinõuna tuleb eelistatult kasutada vinüülist või nitriilkummist, mitte lateksist kindaid. Esimesel nädalal tuleks iga päev kõrvaldada surnud vastsed ja asendada need asendusvastsetega, et säilitada organismide tihedust. Vastseid tuleks sööta vähemalt kaks korda päevas.

12. Kokkupuute-eelse etapi jooksul harjutatakse kulleseid tegeliku kokkupuuteetapi tingimustega nagu sööda liik, temperatuur, valguse ja pimeduse vaheldumise tsükkel ja kasvukeskkond. Seepärast on soovitatav, et sama kasvukeskkonna- ja lahjendusvett kasutataks nii kokkupuute-eelsel ajal kui ka kokkupuute ajal. Kui kulleste kasvatamiseks kokkupuute-eelsel etapil kasutatakse staatilist kasvatamissüsteemi, tuleks kasvukeskkond täielikult asendada vähemalt kaks korda nädalas. Tuleks vältida vastsete liigset tihedust kokkupuute-eelsel etapil, mis põhjustab „trügimist”, kuna sellised efektid võivad märgatavalt mõjutada kulleste arengut edasisel katseetapil. Seepärast ei tohiks kasvatamistihedus olla suurem kui ligikaudu neli kullest kasvukeskkonna liitri kohta (staatilise kokkupuutesüsteemi puhul) või kümme kullest kasvukeskkonna liitri kohta (kusjuures läbivoolu kiirus on näiteks 50 ml/min kokkupuute-eelsel etapil või kasvatamissüsteemis). Sellistes tingimustes peaksid kullesed arenema staadiumist 45/46 staadiumini 51 kaheteistkümne päevaga. Sellist põhipopulatsiooni esindavat kulleste valikut tuleks iga päev uurida arengustaadiumi määramiseks, et leida sobiv aeg kemikaaliga kokkupuute alustamiseks. Kullestele stressi ja traumade tekitamine, eriti nende ümbertõstmise, akvaariumi puhastamise ja vastsete käsitsemise ajal tuleb püüda viia miinimumini. Tuleb vältida stressi tekitavaid tingimusi, nagu vali ja/või lakkamatu müra, akvaariumile koputamine, akvaariumi vibreerimine, liigne askeldamine laboriruumis ja keskkonnatingimuste (valgustatus, temperatuur, pH, lahustunud hapniku sisaldus, vee voolukiirus, jne) järsud muutused. Kui kullesed ei jõua 17 päevaga pärast viljastamist staadiumini 51, tuleb üheks võimalikuks süüdlaseks pidada liigset stressi.

Vastsete kasvatamine ja söötmine

13. Kulleseid söödetakse müügil oleva kullesesöödaga, mida kasutati valideerimisuuringus (vt ka 1. liide), kogu kokkupuute-eelsel ajal (pärast Nieuwkoopi ja Faberi (NF) staadiumi 45/46 (8)) ja kogu 21 päeva kestva katseperioodi jooksul; võib kasutada ka muud sööta, mille kohta on tõendatud, et kahepaiksete metamorfoosi katses annab see sama häid tulemusi. Kokkupuute-eelse perioodi söötmisrežiim tuleks hoolikalt kohandada vastavaks arenevate kulleste vajadustele. See tähendab, et vastkoorunud kullestele tuleb pakkuda väikseid söödakoguseid mitu (vähemalt kaks) korda päevas. Liigseid söödakoguseid tuleks vältida, et *i)* säilitada vee kvaliteeti ja *ii)*, et vältida lõpusefiltrite ummistumist söödaosakeste ja detriidiga. Valideerimisuuringus kasutatud kullesesööda igapäevast kogust

▼M6

tuleks suurendada vastavalt kulleste kasvule kuni ligikaudu 30 mg-ni looma kohta päevas enne katse alustamist. Valideerimisuuringud on näidanud, et kõnealune müügil olev sööt tagab *X. laevis*'e kulleste korraliku kasvu ja arengu ning et see koosneb peentest osakestest, mis püsivad vees kaua aega hõljuvas olekus ning uhutakse lõpuks veevooluga nõust välja. Seepärast tuleks päevane söödakogus jagada väiksemateks osadeks, mida söödetakse kullestele vähemalt kaks korda päevas. Kõnealuse sööda kasutamise kord on esitatud tabelis 1. Söödetavad kogused tuleks registreerida. Sööta võib anda kuivana või valmistada lahjendamisveega põhilahus ja sööta sellega. Sellist põhilahust tuleks uuesti valmistada üle päeva ja muul kui kasutamise ajal hoitakse seda temperatuuril 4 °C.

Tabel 1.

Kahepaiksete metamorfoosi katse valideerimisuuringu elupuhuses järgus kasutatud *X. laevis*'e kulleste kaubandusliku sööda kasutamise kord läbivoolumeetodi tingimustes

Uuringu päev	Söödaratsioon (mg sööta looma kohta päevas)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

Analüütiline keemia

14. Enne uuringu tegemist tuleb hinnata uuritava kemikaali stabiilsust, kasutades olemasolevat teavet kemikaali lahustuvuse, lagundatavuse ja lenduvuse kohta. Igast paralleelkatsenõust tuleb igal kontsentratsioonil võtta proovid analüütilise keemia analüüside jaoks katse alustamise päeval (katse 0-päev) ja seejärel katse jooksul igal nädalal, et saada vähemalt neli proovi. Samuti on soovitatav analüüsida iga uuritavat kontsentratsiooni süsteemi ettevalmistamise ajal, enne katse alustamist, et kontrollida süsteemi toimimist. Lisaks on soovitatav analüüsida põhilahuseid, kui neid vahetatakse, eriti kui põhilahuse ruumala ei ole piisavalt suur, et tagada vajaliku kemikaalikoguse olemasolu keskkonnas kogu rutiinse proovivõtuperioodi kestel. Kui kemikaali ei ole võimalik määrata mõne katses kasutatava kontsentratsiooni või kõigi kontsentratsioonide juures, tuleb määrata kemikaali sisaldus põhilahustes ja registreerida süsteemi voolukiirused, et saaks arvutada nimikontsentratsioonid.

Kemikaali lisamine

15. Meetod, mida kasutatakse uuritava kemikaali lisamiseks süsteemi, sõltub kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Vees lahustuvat kemikaali võib lahustada katsekeskkonna alikvootides, mis võimaldab kemikaali lisada uuritava kontsentratsiooni saavutamiseks läbivoolusüsteemis. Kui kemikaal on toatemperatuuril vedel ja vees halvasti lahustuv, saab seda lisada vedelik-vedeliku küllastusseadme meetoditega. Kui kemikaal on toatemperatuuril tahke ja vees halvasti lahustuv, saab seda lisada klaasvatt-täidisega küllastuskolonni abil (7). Parem oleks kasutada kandeaineta katsesüsteemi, kuid uuritavatel kemikaalidel on erinevad füüsikalis-keemilised omadused, mistõttu tõenäoliselt on vaja kasutada erinevaid meetodeid

▼M6

kemikaali viimiseks vette, milles korraldatakse kokkupuude kemikaaliga. Tuleks püüda toime tulla ilma lahustita või kandeaineta, kuna: *i)* teatavad lahustid võivad ise olla mürgised või avaldada ebasoovitavat või ootamatut endokrinoloogilist mõju, *ii)* kemikaalide uurimine kõrgemal kontsentratsioonil kui nende lahustuvus vees (nagu lahustite kasutamisel võib sageli juhtuda) võib põhjustada vigu tegeliku kontsentratsiooni määramisel ja *iii)* lahusti kasutamine pikaajalises katses võib põhjustada olulist biokilede tekkimist, mis on seotud mikroobide tegevusega. Raskusi valmistava kemikaali uurimisel võib lahustit kasutada viimase võimalusena ning tuleb arvesse võtta OECD juhendit raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonna suhtes avalduva mürgisuse uurimise kohta (4), et teha kindlaks parim meetod. Lahusti valiku määravad kemikaali füüsikalis-keemilised omadused. Veekeskkonna suhtes avalduva mürgisuse uurimisel on edukalt kasutatud lahustina atsetooni, etanooli, metanooli, dimetüülformamiidi ja trietüleenglükooli. Kui kandeainena kasutatakse lahustit, peab lahusti kontsentratsioon olema tunduvalt allpool pikaajaliselt täheldatavat toimet mitteavaldavat kontsentratsiooni (NOEC); OECD juhenddokumendis soovitatakse kontsentratsiooni kuni 100 µl/l; hiljutises ülevaates (12) on soovitatud kasutada lahusti kontsentratsiooni 20 µl lahjendamiseks kasutatava vee 1 liitri kohta. Kui kandeainena kasutatakse lahustit, tuleks hinnata vastavaid lahusti kontrollkatseid, lisaks lahustivabadele kontrollkatsetele (puhas vesi). Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik vee kaudu manustada, kas kemikaali füüsikalis-keemiliste omaduste (madal lahustuvus) või piiratud kättesaadavuse tõttu, võib kaaluda kemikaali manustamist söödaga. Söödaga manustamise teel saavutatud kokkupuute kohta on tehtud eeltöid, kuid sellist kokkupuuteviisi tavaliselt ei kasutata. Meetodi valimine tuleks dokumenteerida ja seda tuleks analüüsi tegemisega kontrollida.

Uuritavate kontsentratsioonide valimine

Suurima uuritava kontsentratsiooni määramine

16. Kõnealuse katse puhul peaks suurima uuritava kontsentratsiooni määrama uuritava kemikaali lahustuvuse piir, ägedat mürgitust põhjustava kemikaali korral suurim talutav kontsentratsioon või tuleks valida kontsentratsioon 100 mg/l, olenevalt sellest, milline neist on väikseim.

17. Uuritava kemikaali suurim talutav kontsentratsioon on suurim kontsentratsioon, mille puhul suremus ägeda mürgituse tõttu on väiksem kui 10 %. Sellise lähenemisviisi kasutamiseks on vaja empiirilisi andmeid suremuse kohta ägeda mürgituse tagajärjel, millest saab hinnata suurima talutava kontsentratsiooni. Sellise kontsentratsiooni hindamine võib olla ebatäpne ja tavaliselt nõuab see professionaalseid teadmisi. Kuigi suurima talutava kontsentratsiooni määramiseks on tehniliselt võib-olla kõige õigem kasutada regressioonimudeleid, võib selle kontsentratsiooni hea lähenduse leida olemasolevatest andmetest ägeda mürgisuse kohta: võetakse 1/3 keskmise letaalse kontsentratsiooni LC_{50} väärtusest. Katses kasutatava liigi kohta ei tarvitse ägeda mürgisuse andmeid siiski olemas olla. Kui liigispetsiifilisi ägeda mürgisuse andmeid ei ole, võib teha 96-tunnise LC_{50} katse kullestega, kes on esindavad (st samas arengustaadiumis) kahepaiksete metamorfoosi katses kasutatavate kulleste suhtes. Kui on olemas andmed muude liikide (nt LC_{50} kalade või muu kahepaikseliigi) kohta, võib kasutada asjatundlikku hindamist, et liikidevahelise ekstrapolatsiooniga hinnata suurim talutav kontsentratsioon.

18. Kui kemikaal ei ole akuutselt toksiline ja on lahustuv üle 100 mg/l, tuleks suurimaks katses kasutatavaks kontsentratsiooniks võtta 100 mg/l, kuna seda loetakse enamasti „praktiliselt mittetoksiliseks.”

▼**M6**

19. Kui läbivoolumeetodiga ei ole võimalik saavutada suurimat talutavat kontsentratsiooni, võib kasutada staatilist uuendussüsteemi, kuigi see ei ole soovitatav meetod. Kui kasutatakse staatilisi uuendamismeetodeid, tuleb dokumenteerida uuritava kemikaali kontsentratsiooni stabiilsus; kontsentratsioon peab püsima lubatava vea piirides. Uuendamise ajavahemikuks soovitatakse võtta 24 tundi. Uuendamise ajavahemik, mis on pikem kui 72 tundi, ei ole lubatav. Lisaks tuleks iga uuendamisajavahemiku lõpus vahetult enne uuendamist mõõta vee kvaliteedi näitajaid (nt lahustunud hapniku sisaldus, temperatuur, pH jne).

Uuritavate kontsentratsioonide vahemik

20. On vaja *vähemalt* kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja kontrollkatset puhta veega (ning kandeaine kontrollkatset, kui kandeaine on vajalik). Katses kasutatud suurima ja väikseima kontsentratsiooni minimaalne erinevus peaks olema umbes üks suurusjärk. Kasutatavate dooside suhe võib olla kuni 0,1 ja võib minimaalselt olla 0,33.

MÄÄRAMISE KÄIK

Katse alustamine ja läbiviimine

Nullpäev

21. Kokkupuudet tuleks alustada siis, kui piisav arv kulleseid kokkupuute-eelses populatsioonis on jõudnud arengustaadiumi 51 vastavalt Nieuwkoopile ja Faberile (8) ja nende vanus on kuni 17 päeva pärast viljastamist. Katseloomade valimiseks võetakse põhipopulatsioonist terveid normaalse välimusega kulleseid ühte anumasse, milles on piisav kogus lahjendusvett. Arengustaadiumi määramiseks tuleks kulleseid ükshaaval võtta kogumisnõust väikse võrgu või võrkfiltriga ja kanda läbipaistvasse mõõtmiskambrisse (nt 100 millimeetrine Petri tass), milles on lahjendusvesi. Staadiumi määramisel on eelistatav mitte kasutada tuimastust, kuid ükshaaval võib kulleseid enne käitlemist tuimastada, kasutades trikaiinmetaansulfonaati (100 mg/l) (nt MS-222), mis on sobivalt puhverdatud naatriumvesinikkarbonaadiga (pH 7,0). Kui tuimastust (näiteks MS-222-ga) kasutatakse, tuleb selle meetodi korralik rakendamine omandada kogenud laboris ja seda tuleks kirjeldada katsetulemuste esitamise juures. Loomi tuleks selle ülekandmise ajal käidelda ettevaatlikult, et viia käitlemisest tingitud stress miinimumini ja vältida nende vigastamist.

22. Looma arengustaadium määratakse kindlaks binokulaarse lahkamismikroskoobi abil. Arengustaadiumi lõpliku varieeruvuse vähendamiseks on oluline viia staadiumi määramine läbi võimalikult täpselt. Vastavalt Nieuwkoopile ja Faberile (8) on staadiumis 51 olevate loomade väljavalimisel esmatähtsaks arengunäitajaks tagajäseme morfoloogia. Tagajäseme morfoloogilisi näitajaid tuleks uurida mikroskoobi all. Kulleste arengustaadiumi kohta põhjaliku teabe saamiseks tuleks kasutada Nieuwkoopi ja Faberi juhendit (8), kuid staadiumi saab usaldatavalt ära määrata silmatorkavate morfoloogiliste tunnuste järgi. Arengustaadiumi määramise lihtsustamiseks ja standardimiseks kogu katse ajal võib kasutada järgmist tabelit, mille kohaselt määratakse silmatorkavad morfoloogilised tunnused, mis on seotud eri staadiumidega, kui eeldatakse normaalset arengut.

▼M6

Tabel 2.

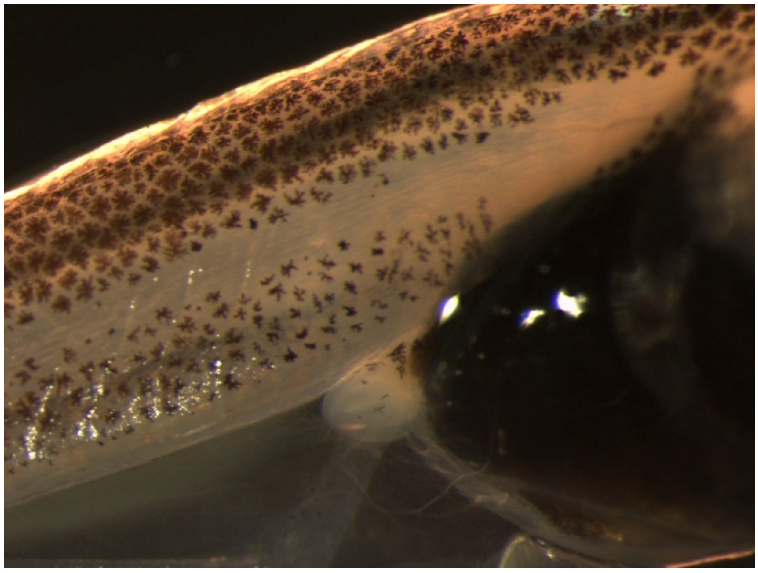
Silmatorkavad morfoloogilised tunnused arengustaadiumi määramiseks Nieuwkoopi ja Faberi juhendi järgi.

Silmatorkavad morfoloogilised tunnused	Arengustaadium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Tagajäse	X	X	X	X	X	X	X									
Esijäse						X	X	X	X	X						
Kraniofatsiaalne struktuur										X	X	X	X			
Haistmisnärvi morfoloogia											X	X	X			
Saba pikkus													X	X	X	X

23. Katse alustamisel peaksid kõik kullesed olema staadiumis 51. Selle staadiumi kõige silmatorkavam morfoloogiline tunnus on tagajäseme morfoloogia, mis on näidatud joonisel 1.

Joonis 1.

***Xenopus laevis*'e kullese tagajäseme morfoloogia arengustaadiumis 51.**



24. Lisaks arengustaadiumi valikule võib katseloomi soovi korral valida veel suuruse järgi. Selleks tuleks nullpäeval mõõta keha kogupikkus (mitte vahemaa ninamikust pärakuavani) ligikaudu 20st kullesest koosneva alarühma jaoks, kes on Nieuwkoopi ja Faberi (NF) staadiumis 51. Pärast keskmise keha kogupikkuse arvutamist selle kulleste alarühma jaoks võib katseloomade kogupikkuse jaoks seada ülem- ja alampiiri vahemikus keskmine pikkus ± 3 mm (staadiumi 51 kulleste keskmine keha kogupikkus on vahemikus 24,0–28,1 mm). Siiski määratakse iga katselooma küpsus katses osalemiseks peamiselt arengustaadiumi järgi. Kullesed, kellel esineb selgelt nähtavaid väärarendeid või vigastusi, tuleks katsest välja jätta.

▼M6

25. Kullesed, kes vastavad eespool kirjeldatud arengustaadiumi etapi kriteeriumidele, pannakse puhta kasvatamisveega nõusse, kuni staadiumi määramine on lõpule viidud. Kui staadiumide määramine on lõpetatud, jaotatakse kullesed juhuslikult uuritava kemikaaliga kokkupuute nõudesse, kuni igas nõus on 20 kullest. Iga kokkupuutenõu loomad vaadatakse seejärel üle ebanormaalse välimuse suhtes (näiteks vigastused, ebanormaalne ujumisviis, jne). Selgelt haiglase välimusega kullesed tuleks kokkupuutenõudest kõrvaldada ja asendada värskelt valitud kullestega kogumisnõust.

Vaatlused

26. Põhjalikum teave katse lõpetamise korra ja kulleste töötlemise kohta on esitatud kahepaiksete kilpnäärme histoloogiat käsitlevas OECD juhenddokumendis (9).

7. päeval tehtavad mõõtmised

27. Igast paralleelkatsenõust eemaldatakse 7. päeval viis juhuslikult valitud kullest. Kasutatav juhusliku valiku kord peaks tagama igale katseloomale ühesuguse tõenäosuse olla valitud. Seda on võimalik saavutada iga juhuvalikumeetodiga, kuid selle jaoks tuleb kõik kullesed püüda võrku. Valimata jäänud kullesed lastakse esialgsesse nõusse tagasi ja väljavalitud kullesed surmatakse humaanselt näiteks MS-222 lahuses kontsentratsiooniga 150–200 mg/l, mille pH on naatriumvesinikkarbonaadi juuresolekul viidud 7,0 juurde. Humaanselt surmatud kullesed loputatakse veega ja pühitakse kuivaks; seejärel määratakse kehamass milligrammi täpsusega. Iga kullese puhul määratakse tagajäseme pikkus, vahemaa ninamikust kuni pärakuavani ja (binokulaarse lahkamismikroskoobi abil) arengustaadium.

21. päeval tehtavad mõõtmised (katse lõpetamine)

28. Katse lõpetamisel (21. päeval) eemaldatakse ülejäänud kullesed katsenõudest ja surmatakse humaanselt näiteks MS-222 lahuses (150–200 mg/l), mis on puhverdatud naatriumvesinikkarbonaadiga, nagu eespool kirjeldatud. Kullesed loputatakse veega ja pühitakse kuivaks; seejärel määratakse kehamass milligrammi täpsusega. Iga kullese puhul määratakse arengustaadium, vahemaa ninamikust kuni pärakuavani ja tagajäseme pikkus.

29. Kõik vastsed paigutatakse Davidsoni fikseerimislahusesse 48–72 tunniks, kas kogukehaproovina või kärbitud, aga alalõuga sisaldava pea kudede proovina histoloogiliseks hindamiseks. Histopatoloogiliste uuringute jaoks valitakse kokku viis kullest igast paralleelkatsenõust. Kuna folliikulirakkude kõrgus sõltub arengustaadiumist (10), on histoloogiliseks analüüsiks kulleste valimisel kõige sobivam meetod kasutada alati samas staadiumis olevaid isendeid, kui see on võimalik. Samas arengustaadiumis isendite valimiseks tuleb enne nende väljavalimist ja andmete saamiseks ja säilitamiseks vajalikku edasist töötlemist määrata kõigi kulleste arengustaadium. See on vajalik, kuna arengus ilmneb normaalne divergents, mille tõttu igas paralleelkatsenõus tekib erinev jaotus arengustaadiumide järgi.

30. Histopatoloogiliseks analüüsiks valitud loomi (n = 5 igast paralleelkatsenõust) tuleks võrrelda kontrollkatse (ühendatud paralleelkatsed) mediaanses arengustaadiumis olevate loomadega, kui see on võimalik. Kui paralleelkatsenõus on rohkem kui viis kullest sobivas staadiumis, valitakse viis kullest juhuvalikuga.

▼M6

31. Kui paralleelkatsenõus on vähem kui viis kullest sobivas staadiumis, võetakse lähimast madalamast või kõrgemast arengustaadiumist viis juhuslikult valitud kullest, et jõuda valimi üldsuuruseni viis kullest paralleelkatse kohta. Eelistatavalt tuleks otsus – võtta valimisse täiendavaid vastseid lähimast madalamast või kõrgemast arengustaadiumist – teha üldise hinnangu põhjal, milline on kulleste jaotus arengustaadiumide järgi kontrollkatsenõudes ja kemikaaliga kokkupuute uurimise nõudes. See tähendab, et kui kemikaaliga kokkupuude pidurdab arengut, peaksid täiendavad kullesed olema võetud lähimast madalamast staadiumist. Kui kemikaaliga kokkupuude aga kiirendab arengut, peaksid täiendavad kullesed olema võetud lähimast kõrgemast staadiumist.

32. Kui kokkupuude uuritava kemikaaliga tekitab suuri muutusi kulleste arengus, ei tarvitse kemikaaliga kokkupuutesse viidud rühmadel olla arengustaadiumide jaotuse poolest kontrollkatse arvutatud mediaanse arengustaadiumiga kattuvust. Ainult sellistel juhtudel tuleks valimismeetodit muuta ja kasutada kontrollrühma mediaansest staadiumist erinevat arengustaadiumi, et saada arengustaadiumi järgi sobitatud proovid kulleste kilpnäärme histopatoloogia uurimiseks. Lisaks sellele, kui arengustaadiume ei saa määrata (nt asünkroonia tõttu), tuleks igast paralleelkatsenõust võtta juhuslikult viis kullest histoloogilise analüüsi jaoks. Aruandes tuleks selgitada, milliste põhimõtete alusel võeti valimisse kullesed, kes on muus arengustaadiumis kui kontrollrühma mediaanne arengustaadium.

Bioloogiliste näitajate määramine

33. 21-päevase kokkupuuteetapi ajal mõõdetakse tähtsamaid näitajaid 7. ja 21. päeval, kuid katseloomi on vaja jälgida iga päev. Tabelis 3 on antud ülevaade mõõdetavatest näitajatest ja vastavatest vaatlusaegadest. Üksikasjalikum teave, kuidas apikaalsete näitajate mõõtmisi ja histoloogilisi hindamisi tehniliselt teostatakse, on esitatud OECD juhenddokumendis (9).

Tabel 3.

Tähtsaimate näitajate määramise ajad kahepaiksete metamorfoosi katses.

Apikaalsed näitajad	Iga päev	7. päev	21. päev
— suremus	•		
— arengustaadium		•	•
— tagajäseme pikkus		•	•
— vahemaa ninamikust kuni pärakuavani		•	•
— keha märgmass		•	•
— kilpnäärme histoloogia			•

▼M6

Apikaalsed näitajad

34. Kahepaiksete metamorfoosi katse apikaalsed näitajad on arengustaadium, tagajäseme pikkus, ninamiku-pärakuava vahekaugus ja märgmass ning igaüht neist on lühidalt vaadeldud allpool. Täpsem tehniline lisateave neid näitajaid käsitlevate andmete kogumise ja arvuti abil analüüsimise kohta on esitatud viidatud juhenddokumentides, mida on soovitatav kasutada.

Arengustaadium

35. *X. laevis*'e kulleste arengustaadium määratakse vastavalt Nieuwkoopi ja Faberi (8) esitatud arengustaadiumide määramise kriteeriumidele. Arengustaadiumi andmeid kasutatakse selleks, et teha kindlaks, kas areng on kiirenenud, muutunud asünkroonseks, aeglustunud või jäänud mõjutamata. Arengu kiirenemine või aeglustumine määratakse kindlaks kontrollrühma ja katserühmade kulleste saavutatud mediaanse arengustaadiumi võrdlemisel. Asünkroonse arenguga on tegemist siis, kui uuritud koed ei ole väärmoodustistega ega ebanormaalsed, kuid ühe kullese morfogeneesi suhteline ajastus või eri kudede arengu ajastus on häiritud.

Tagajäseme pikkus

36. Kilpnäärmehormoonide kontrolli all olevad tagajäseme diferentseerumine ja kasv on peamised arengunäitajad, mida on juba kasutatud arengustaadiumi määramisel. Tagajäseme areng on arengustaadiumi määramisel kvalitatiivne näitaja, kuid siin vaadeldakse seda kvantitatiivse näitajana. Seepärast mõõdetakse tagajäseme pikkus kui näitaja, mis võimaldab kindlaks teha mõju kilpnäärmeteljele (joonis 2). Kooskõla tagamiseks mõõdetakse vasema tagajäseme pikkust. Tagajäseme pikkust hinnatakse nii katse 7. kui ka 21. päeval. 7. päeval mõõdetakse tagajäset lihtsalt, nagu on näidatud joonisel 2. 21. päeval on tagajäseme pikkuse mõõtmine aga keerulisem, kuna tagajäsemel on paindekohad. Seepärast tuleks tagajäseme pikkuse mõõtmisel 21. päeval alustada kehaseinast ja mõõta piki jäseme keskjoont, järgides kõiki jäseme kõverusi. Muutusi tagajäseme pikkuses 7. päeval, isegi kui neid ei ole 21. päeval, peetakse ikkagi oluliseks kilpnäärmele avalduva võimaliku mõju kindlakstegemisel. Pikkuse mõõtmise tulemused saadakse digifotolt, kasutades kujutise analüüsi tarkvara, mida on kirjeldatud OECD juhenddokumendis kahepaiksete kilpnäärme histoloogilise uuringu kohta (9).

Kehapikkus ja märgkaal

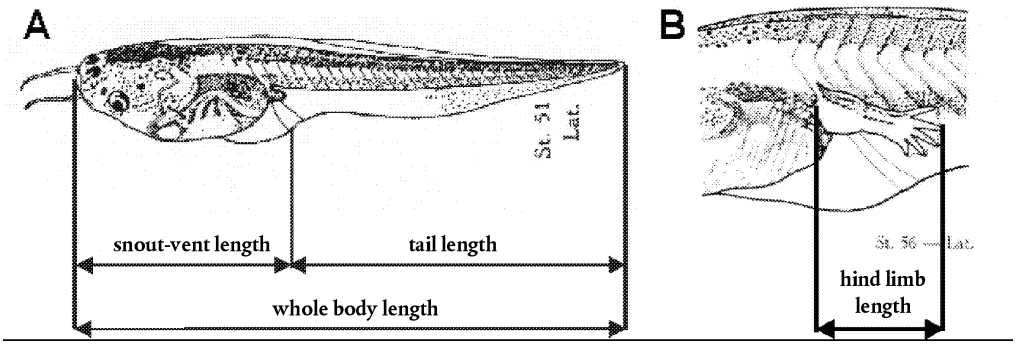
37. Ninamiku-pärakuava vahekauguse (SVL) (joonis 2) ja märgmassi mõõtmine on võetud katse-eeskirja, et hinnata uuritava kemikaali võimalikku mõju kulleste kasvukiirusele, võrreldes kontrollrühmaga, ja see on kasulik uuritava kemikaali üldise mürgisuse tuvastamisel. Kuna vee eemaldamine kulleste kehamassi määramiseks võib kullestel tekitada stressi ja põhjustada nahavigastusi, tehakse need mõõtmised 7. päeval valitud kulleste alarühmas ja kõigi ülejäänud kulleste puhul katse lõpus (21. päev). Kooskõla huvides kasutatakse pärakuava koljupoolset serva sabapikkuse mõõtmisel piirina.

38. Kulleste kasvu hindamiseks kasutatakse ninamiku-pärakuava vahekaugust (SVL), nagu on näidatud joonisel 2.

▼M6

Joonis 2.

***X. laevis*'e kulleste kehapikkust iseloomustavad mõõtmised (A) ja tagajäseme pikkuse mõõtmine (B) (1).**



Kilpnäärme histoloogia

39. Kuigi arengustaadium ja tagajäseme pikkus on olulised näitajad, mille järgi hinnatakse kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutusi metamorfilises arengus, ei saa arengu aeglustumist iseendast pidada kilpnäärmeaktiivsuse vastaseks diagnostiliseks indikaatoriks. Mõned muutused võivad olla nähtavad üksnes põhjaliku histopatoloogilise analüüsiga. Diagnostiliste kriteeriumide hulka kuuluvad kilpnäärme hüpertroofia/atroofia, folliikulirakkude hüpertroofia ja hüperplaasia ning täiendavate kvalitatiivsete kriteeriumidena: folliikuli valendiku ristlõikepindala, kolloidsus ja folliikulirakkude kõrgus ja kuju. Registreeritakse mõju olulisus (neli astet). Teave histoloogiliseks analüüsiks vajalike proovide saamise ja töötlemise ning koeproovide histoloogilise analüüsi kohta on esitatud juhenddokumentides „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 – Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation" ning „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas" (9). Labor, milles katset tehakse esimest korda (esimesi kordi), peaks pöörduma õppimiseks ja nõuannete saamiseks kogenud patoloogi poole, enne kui ta asub tegema histoloogilist analüüsi ja hindama kilpnääret. Apikaalsete näitajate ilmsed ja olulised muutused, mis näitavad arengu kiirendamist või asünkroonsust, võivad muuta kilpnäärme histopatoloogilise analüüsi mittevajalikuks. Selgete morfoloogiliste muutuste või arengupeetust näitavate tõendite puudumine tähendavad siiski, et on vaja teha histoloogiline analüüs.

Suremus

40. Kõiki nõusid tuleb kontrollida iga päev surnud kulleste suhtes ja iga nõu kohta need numbrid registreeritakse. Iga surmajuhtumi kohta registreeritakse kuupäev, kemikaali kontsentratsioon ja nõu number. Surnud loomad tuleks katsenõudest kohe eemaldada, kui neid märgatakse. Suremuse määr üle 10 % võib osutada sobimatutele katsetingimustele või uuritava kemikaali mürgisusele.

Täiendavad tähelepanekud

41. Ebanormaalse käitumise juhtumid ja selgelt nähtavad väärarendid ning kahjustused tuleks registreerida. Iga ebanormaalse käitumise juhtumi, selgelt nähtava väärarendi või kahjustuse kohta registreeritakse kuupäev, kemikaali kontsentratsioon ja nõu number. Normaalse käitumisega kullesed hõljuvad veesambas, saba peast kõrgemal, sabauim peksleb korrapäraselt kindlas rütmis, nad tõusevad aeg-ajalt pinnale, nende lõpusekatted

▼M6

liiguvad ja nad reageerivad ärritajatele. Ebanormaalse käitumise näideteks on pinnal hõljumine, nõu põhjas lebamine, ümberpööratud või ebakorrapärane ujumine, pinnale mittetõusmine ja ärritajatele mitte reageerimine. Lisaks tuleks protokollis registreerida suured erinevused sööda tarbimises eri kontsentratsiooniga katsenõudes. Olulisteks väärarenditeks ja kahjustusteks võivad olla morfoloogilised kõrvalekalded (näiteks deformeerunud jäsemed), hemorraagilised lesioonid, bakteri- või seennakkused, kui nimetada vaid mõnda. Sellised otsustused on kvalitatiivsed ja neid tuleks käsitleda kui haiguse või stressi kliinilisi tunnuseid võrdluses kontrollrühma loomadega. Kui selliste tunnuste esinemine või esinemismäär on kemikaaliga kokkupuute uurimise nõudes suurem kui kontrollrühmas, tuleks neid käsitada selge mürgisuse tunnustena.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete kogumine

42. Kõik andmed tuleks koguda elektrooniliste või käsitsi mõõtmise süsteemide abil, mis vastavad heale laboritavale. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist:

Uuritav kemikaal:

— uuritava kemikaali iseloomustus: füüsikalis-keemilised omadused; teave stabiilsuse ja biolagunevuse kohta;

— keemiline teave ja andmed: lahjenduste valmistamise meetod ja sagedus. Uuritavat kemikaali käsitlev teave hõlmab selle tegelikke ja nimikontsentratsioone ning mõnel juhul, kui see on asjakohane, ka teavet süsteemis tekkivate ühendite kontsentratsioonide kohta. Uuritavat kemikaali võib olla vajalik määrata nii põhilahuses kui ka uuritavates lahustes;

— lahusti (kui kandeaine on muu kui vesi): lahusti valiku põhjendus ja lahusti omadused (nimetus, kasutatud lahusti kontsentratsioon);

Katsetingimused:

— andmed katse läbiviimise kohta: need hõlmavad tähelepanekuid katsesüsteemi, toetava keskkonna ja taristu toimimise kohta. Tüüpilised andmed hõlmavad järgmist: ruumi temperatuur, katsenõude temperatuur, valgustusperiood, kokkupuutesüsteemi oluliste osade (nt pumbad, tsükliloendajad, rõhud) toimimine, voolukiirused, veetasemed, varulahusepudeli vahetamised ja andmed söötmise kohta. Üldised vee kvaliteedi näitajad on järgmised: pH, lahustunud hapniku sisaldus, elektrijuhtivus, joodi üldsisaldus, leelisus ja karedus;

— kõrvalekalded katsemeetodist: selles osas tuleks esitada teave või selgitused kõigi katsemeetodist kõrvalekaldumiste kohta;

Tulemused:

— bioloogilised tähelepanekud ja andmed: need hõlmavad iga päev tehtud tähelepanekuid surmajuhtumite, sööda tarbimise, ebanormaalse ujumise, letargia, tasakaalukaotuste, väärarendite, vigastuste jne kohta. Ettenähtud ajavahemike järel kogutavad tähelepanekud ja andmed hõlmavad järgmist: arengustaadium, tagajäseme pikkus, ninamiku-pärakuava vahekaugus ja märgkaal;

▼M6

— statistilise analüüsi meetodid ja kasutatud meetodite õigustus; statistilise analüüsi tulemused, eelistatavalt tabelitena;

— histoloogilised andmed: need hõlmavad jutustavat kirjeldust, samuti konkreetseid tähelepanekuid, millele on omistatud raskusastme ja esinemissageduse hindepunktid, nagu on üksikasjalikult kirjeldatud histopatoloogia juhenddokumendis;

— konkreetset juhtumit käsitlevad tähelepanekud: sellised tähelepanekud peaksid hõlmama jutustavat kirjeldust kõigest uuringu käigus nähtust, mis ei kuulu eespool kirjeldatud kategooriatesse.

Andmete esitamine

43. Iga päev kogutavate andmete tabelid on esitatud 2. liites; neid võib kasutada lähteandmete sisestamise ja kokkuvõtvate statistiliste arvutuste tegemise suunisena. Lisaks on esitatud aruandetabelid, milles on mugav esitada määratavaid näitajaid käsitlevaid koondandmeid. 2. liites on esitatud ka histoloogilise hindamise aruandetabelid.

Uuringu kvaliteedi kriteeriumid ja uuringu vastuvõetavus/nõuetekohasus

44. Üldiselt tähendavad suured kõrvalekalded katsemeetodist, et andmeid ei saa kasutada tõlgendamiseks ega katsearuandes esitamiseks. Seepärast on töötatud välja allpool tabelis 4 esitatud kriteeriumid, mis aitavad määrata tehtud uuringu kvaliteeti ja hinnata üldist katseloomade olukorda.

Tabel 4.

Kahepaiksete metamorfoosi katse kvaliteedi kriteeriumid

Kriteerium	Lubatavad piirid
Uuritava aine kontsentratsioonid katses	Katses mõõdetud kontsentratsiooni varieerumine (KV) püsib 21 päeva jooksul vahemikus ≤ 20 %
Suremus kontrollrühmades	≤ 10 % – kontrollrühma paralleelkatsetes ei tohiks suremus olla suurem kui 2 kullest rühma kohta
Kontrollrühmade minimaalne mediaanne arengustaadium katse lõpus	57
Kontrollrühma arengustaadiumide jaotus	Arengustaadiumide jaotuse 10. ja 90. protsentiil ei tohiks erineda rohkem kui 4 staadiumi võrra
Lahustunud hapniku kontsentratsioon	≥ 40 % õhu küllastuskontsentratsioonist (*)
pH	pH peaks olema hoitud vahemikus 6,5–8,5. Paralleelrühmade ja eri kontsentratsioonide rühmade nõudes ei tohi erinevus olla suurem kui 0,5.
Vee temperatuur	22 ± 1 °C. Paralleelrühmade ja eri kontsentratsioonide rühmade nõudes oleva vee temperatuuri erinevus ei tohi olla suurem kui 0,5 °C.
Katses kasutatud, ilma selge mürgisuseta kontsentratsioonide arv	≥ 2
Paralleelkatsete tulemused	Kuni 2 paralleelkatset kogu uuringu kohta võivad ebaõnnestuda

▼**M6**

Kriteerium	Lubatavad piirid
Eritingimused lahusti kasutamise korral	Kui kandeainena kasutatakse lahustit, tuleb teha nii lahusti kontrollkatsed kui ka kontrollkatsed puhta veega ja esitada tulemused
	Statistiliselt olulisi erinevusi lahusti kontrolli ja vee kontrolli vahel töödeldakse eraldi. Vt allpool lisateave
Staatilise uuendussüsteemi eritingimused	Tuleb teatada esindavate keemiliste analüüside tulemused enne ja pärast uuendamist
	Vahetult enne uuendamist tuleks mõõta ammoniaagisisaldust
	Vahetult enne uuendamist tuleks mõõta kõik veekvaliteedi parameetrid, mis on loetletud 1. liite tabelis 1
	Uuendamiste vahel ei tohiks olla rohkem kui 72 tundi
	Sobiv söötmise ajakava (50 % igapäevasest söödaratsioonist peab olema kaubanduses leiduv kullesesööt)

(*) Vee õhustatuse taset võib hoida barboteerimisseadme (mullitaja) abil. Mullitaja on soovitatav seadistada sellisele intensiivsusele, et mullid ei tekitaks kullestele asjatut stressi.

Katse nõuetekohasus

45. Katset võib pidada vastuvõetavaks ja nõuetekohaseks, kui on täidetud järgmised nõuded.

Katse, mille puhul otsustati, et mõju kilpnäärmele puudub, on nõuetekohane, kui:

(1) igas kemikaaliga kokkupuute rühmas ja ka kontrollrühmas ei ületa suremus 10 %. Üheski paralleelkatses ei tohi suremus olla suurem kui kolm kullest, muidu loetakse paralleelkatse kehtetuks;

(2) vähemalt kahel uuritava kemikaaliga kokkupuute kontsentratsioonil peavad kõik neli paralleelkatset olema õnnestunud ja analüüsiks kasutatavad;

(3) vähemalt kaks uuritava kemikaaliga kokkupuute kontsentratsiooni, mis ei põhjusta selget mürgistust, peavad olema kasutatavad analüüsiks.

Katse, mille puhul otsustati, et kemikaal avaldab mõju kilpnäärmele, on nõuetekohane (kehtib), kui:

(1) kontrollrühmades ei ületa suremus kahte kullest paralleelkatse kohta.

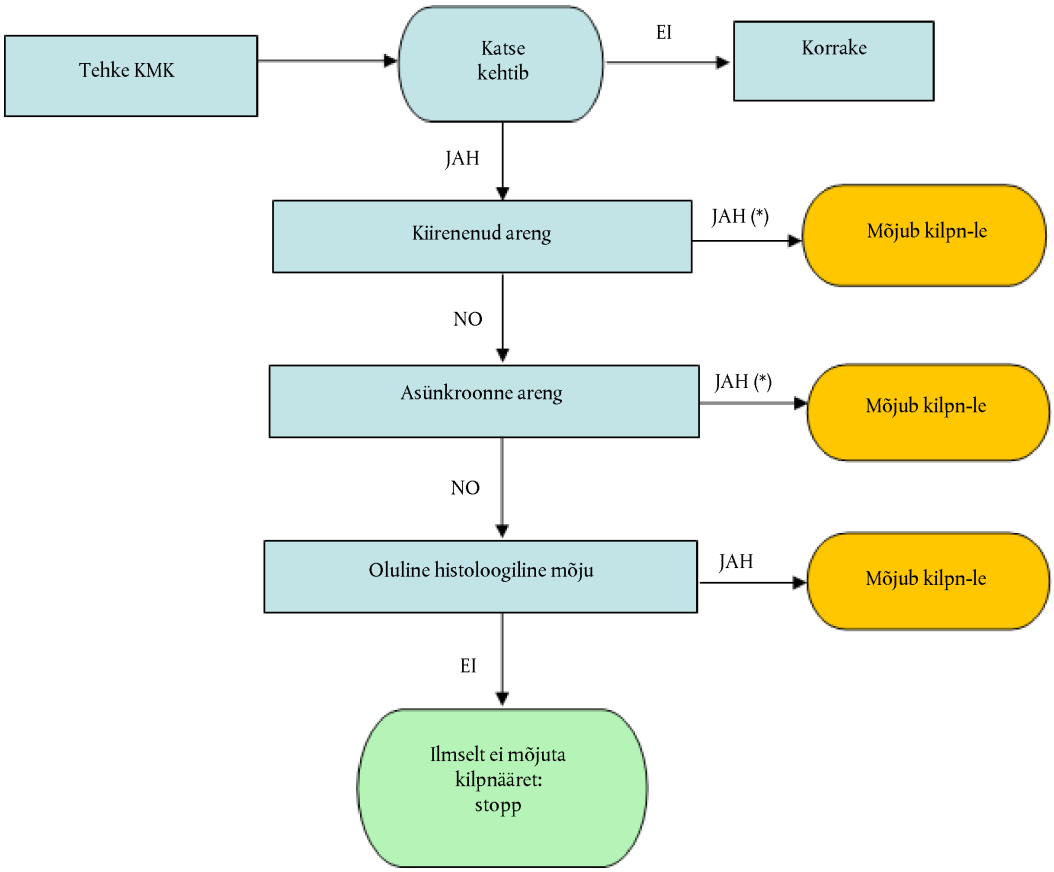
Otsustamisskeem kahepaiksete metamorfoosi katse puhul

46. Otsustamisskeem kahepaiksete metamorfoosi katse jaoks töötati välja selleks, et see aitaks biokatset läbi viia ja selle tulemusi loogiliselt tõlgendada (vt skeem joonisel 3). Otsustamisskeemis tegelikult kaalutakse määratud näitajaid, kusjuures arengu kiirenemisele, asünkroonsele arengule ja kilpnäärme histopatoloogiale omistatakse suur kaal ning arengu aeglustumisele, ninamiku-päraku vahemaale ja keha märgkaalule, mida võib mõjutada kemikaali üldine mürgisus, omistatakse väiksem kaal.

▼**M6**

Joonis 3.

Otsustamisskeem kahepaiksete metamorfoosi katse (KMK, ingl k. AMA) puhul



(*) Mõni reguleeriv asutus võib nõuda histoloogia uurimist, vaatamata olulistele erinevustele, mis avalduvad kiirenenud arengu ja asünkroonse arenguna. Käesolevat uuringut tegeval laboril soovitatakse vajaliku pädeva asutusega enne uuringu tegemist nõu pidada, et teha kindlaks, milliste näitajate määramist nõutakse.

Kiirenenud areng (tehakse kindlaks arengustaadiumi, ninamiku-päraku vahemaa ja tagajäseme pikkuse alusel)

47. Kiirenenud areng esineb teadaolevalt üksnes kilpnäärmehormoonidega seotud mõjude toimel. See võib olla mõju perifeersetele kudedele, mida põhjustab kilpnäärmehormooni otsene sidumine selle hormooni retseptorile (näiteks T4-le), või mõju, mis muudab kilpnäärmehormooni sisaldust veres. Kummalgi juhul peetakse seda piisavaks tõendiks, mis näitab, et kemikaal mõjutab kilpnääret. Kiirenenud arengut hinnatakse ühel meetodil kahest. Kõigepealt võib hinnata üldist arengustaadiumi, kasutades standardmeetodit, mida on üksikasjalikult kirjeldanud Nieuwkoop ja Faber (8). Teiseks võib arvuliselt väljendada konkreetseid morfoloogilisi omadusi nagu tagajäseme pikkus 7. ja 21. päeval, millel on positiivne korrelatsioon agonistliku mõjuga kilpnäärmehormooni retseptorile. Kui esineb statistiliselt oluline arengu kiirenemine või tagajäseme pikkuse suurenemine, siis näitab uuring, et kemikaal mõjutab kilpnääret.

▼**M6**

48. Katseloomade arengu kiirenemise hindamine, võrreldes kontrollrühma loomadega, toimub järgmise nelja näitaja statistilise analüüsi tulemuste põhjal:

— tagajäseme pikkus (normeeritud ninamiku-päraku vahemaaga) uuringu 7. päeval;

— tagajäseme pikkus (normeeritud ninamiku-päraku vahemaaga) uuringu 21. päeval;

— arengustaadium uuringu 7. päeval;

— arengustaadium uuringu 21. päeval.

49. Tagajäseme pikkuse statistiline analüüs peab põhinema vasaku tagajäseme pikkuse mõõtmise tulemustel. Tagajäseme pikkus normeeritakse; selleks leitakse looma tagajäseme pikkuse ja ninamiku-päraku vahemaa suhtarv. Normeeritud väärtuste keskväärtusi iga kontsentratsioonitaseme juures võrreldakse omavahel. Arengu kiirenemist näitab tagajäseme (normeeritud) pikkuse keskväärtuse oluline suurenemine kemikaaliga kokkupuute rühmades, võrreldes kontrollrühma vastava näitajaga 7. ja/või 21. päeval (vt 3. liide).

50. Arengustaadiumide statistiline analüüs peaks põhinema arengustaadiumi määramisel, lähtudes Nieuwkoopi ja Faberi (8) morfoloogilistest kriteeriumidest. Arengu kiirenemist näitab see, kui arengustaadiumi väärtuste multikvantaalse analüüsiga leitakse selle oluline suurenemine kemikaaliga kokkupuute rühmades, võrreldes kontrollrühma vastava näitajaga 7. ja/või 21. päeval.

51. Kahepaiksete metamorfoosi katse puhul loetakse kas või ühelegi eespool nimetatud neljast näitajast avalduvat märkimisväärset mõju piisavaks tõendiks, et areng on kiirenenud. See tähendab, et olulist mõju tagajäseme pikkusele konkreetsel ajahetkel ei pea kinnitama oluline mõju tagajäseme pikkusele teisel ajahetkel ega oluline mõju arengustaadiumile samal ajahetkel. Teiselt poolt, olulist mõju arengustaadiumile konkreetsel ajahetkel ei pea kinnitama oluline mõju arengustaadiumile teisel ajahetkel ega oluline mõju tagajäseme pikkusele samal ajahetkel. Tõendusmaterjal kiirenenud arengu kohta muutub siiski kaalukamaks, kui oluline mõju tuvastatakse mitmele näitajale.

Asünkroonne areng (määratakse arengustaadiumide kriteeriumide põhjal)

52. Asünkroonsele arengule on iseloomulik see, et ühe kullese morfogeneesi või eri kudede arengu suhteline ajastus on häiritud. Kui iga konkreetse staadiumi puhul tüüpiliseks peetavate morfoloogiliste näitajate komplekti abil ei ole võimalik selgelt kindlaks teha looma arengustaadiumi, näitab see, et koed arenevad metamorfoosi ajal asünkroonselt. Asünkroonne areng näitab, et kemikaal mõjutab kilpnääret. Ainsad asünkroonset arengut põhjustavad teadaolevad toimemehhanismid on kemikaalide mõju kilpnäärmehormoonide perifeersele mõjule ja/või kilpnäärmehormoonide metabolismile arenevates kudedes, nagu on täheldatud dejodinaasi inhibiitorite puhul.

▼**M6**

53. Asünkroonse arengu hindamine katseloomadel võrreldes kontrollrühmade loomadega põhineb üldisel morfoloogilisel hindamisel, mis toimub uuringu 7. ja 21. päeval.

54. Nieuwkoopi ja Faberi esitatud *Xenopus laevis*'e normaalse arengu kirjeldus (8) määrab raamistiku, mille põhjal tehakse kindlaks normaalne kudede ümberkujunemise järjestus. Mõiste „asünkroonne areng” osutab konkreetselt sellistele kõrvalekalletele kullese üldises morfoloogilises arengus, mis ei võimalda arengustaadiumi kindlat määramist Nieuwkoopi ja Faberi (8) kriteeriumide alusel, kuna peamised morfoloogilised tunnused osutavad eri arengustaadiumidele.

55. Nagu ütleb juba termin „asünkroonne areng”, tuleks siin vaadelda üksnes juhtumeid, kus konkreetsete kudede ümberkujunemise käigus esineb kõrvalekalle, võrreldes muude kudede ümberkujunemise käiguga. Mõned klassikalised välised avaldumisvormid on esijäsemete hilinenud moodustumine või moodustumata jäämine, vaatamata sellele, et tagajäsemed ja saba koed arenevad normaalselt või isegi kiiremini, või lõpuste enneaegne resorbeerumine, võrreldes tagajäseme morfogeneesi ja saba resorbeerumise staadiumiga. Looma areng loetakse asünkroonseks, kui talle ei saa omistada arengustaadiumi, kuna ta ei vasta enamikule olulistele Niewkoopi ja Faberi (8) staadiumide kriteeriumidele, või kui tal esineb ühe või mitme olulise tähtsusega tunnuse ilmumise suur hilinemine või kiirenemine (nt saba on täielikult resorbeerunud, kuid esijäsemeid ei ole tekkinud). See hindamine toimub kvalitatiivselt ja seejuures tuleks uurida kõiki Nieuwkoopi ja Faberi (8) loetletud olulisi arengutunnuseid. Siiski ei ole vaja registreerida uuritava looma iga olulise tunnuse arengustaadiumi. Kui loom tunnistatakse asünkroonse arenguga isendiks, siis talle Nieuwkoopi ja Faberi (8) järgi arengustaadiumi ei omistata.

56. Seega keskne kriteerium, mille järgi ebanormaalse morfoloogilise arengu juhtumid tunnistatakse asünkroonse arengu juhtumiteks, on see, et kudede ümberkujunemise suhteline ajastus ja kudede morfogenees on häiritud, samas kui vastavate kudede morfoloogia ise ei ole selgelt ebanormaalne. Üks suurte morfoloogiliste kõrvalekallete sellist tõlgendust illustreeriv näide on see, et tagajäseme hilinenud morfogenees võrreldes muude kudede arenguga vastab asünkroonse arengu kriteeriumile; juhtumeid, kus tagajäsemed hoopis puuduvad, sõrmed on ebanormaalsed (nt mõni sõrm/varvas või selle osa puudub, esineb lisasõrmi/-varbaid), või muid ilmseid jäsemete väärarenguid ei loeta asünkroonseks arenguks.

57. Peamised morfoloogilised tunnused, mille koordineeritud toimumist metamorfoosi ajal tuleb hinnata selles kontekstis, peaksid hõlmama tagajäseme morfogeneesi, esijäseme morfogeneesi, esijäseme ilmumist, saba resorbeerumise staadiumi (eelkõige sabauime resorbeerumist) ja pea morfoloogiat (näiteks lõpuste suurus ja resorptsiooni järk, alalõua morfoloogia, Meckeli kõhre esiletungimine).

58. Olenevalt kemikaali toimest võib esineda mitmesuguseid suuri morfoloogilisi fenotüüpe. Mõned klassikalised välised avaldumisvormid (fenotüübid) on esijäsemete hilinenud moodustumine või puudumine, vaatamata sellele, et tagajäsemed ja saba koed arenevad normaalselt või isegi kiiremini, lõpuste enneaegne resorbeerumine, võrreldes tagajäseme ja saba ümberkujunemisega.

▼**M6**

Histopatoloogia

59. Kui kemikaal ei ole selgelt mürgine, ei kiirenda arengut ega põhjusta asünkroonset arengut, siis hinnatakse asjakohase juhenddokumendi (9) abil kilpnäärme histopatoloogiat. Arengu pidurdumine mürgisuse puudumise korral on selge märk kilpnäärmevastase toime kohta, kuid arengustaadiumide analüüsimine on vähem tundlik ja väiksema diagnostilise väärtusega kui kilpnäärme histopatoloogiline analüüs. Seepärast on sellisel juhul vaja teha kilpnäärme histopatoloogiline analüüs. Mõju kilpnäärme histoloogiale on tõendatud ka siis, kui mõju arengule ei leitud. Kui kilpnäärmes leitakse histopatoloogilisi muutusi, loetakse, et kemikaal mõjutab kilpnääret. Kui ei ole arengu aeglustumisi ega kilpnäärme histoloogilisi kahjustusi, siis loetakse, et kemikaal kilpnääret ei mõjuta. Sellise otsuse aluseks on asjaolu, et kilpnääre on teda stimuleeriva hormooni (*thyroid stimulating hormone*, TSH) mõju all ja iga kemikaal, mis muudab veres olevat kilpnäärmehormooni taset piisavalt, et muutuks TSH sekretsioon, põhjustab kilpnäärmes histopatoloogilisi muutusi. Kilpnäärmehormooni tase veres võib muutuda mitmesugusel viisil ja mitmesuguse toimemehhanismi kaudu. Seega, kilpnäärmehormooni tase veres küll näitab, et on olemas kilpnäärmega seotud mõju, kuid ei ole piisav selleks, et teha kindlaks, millise toimemehhanismi kaudu mõju avaldub.

60. Kuna seda näitajat ei saa peamiste statistiliste lähenemisviiside alusel uurida, tehakse kemikaaliga kokkupuute poolt põhjustatud mõju kindlaks patoloogi eksperdiarvamuse abil.

Aeglustunud areng (tehakse kindlaks arengustaadiumi, tagajäseme pikkuse, kehamassi ja ninamiku-päraku vahemaa abil)

61. Arengu aeglustumist võivad põhjustada kilpnäärmevastased mehhanismid ja ka kaudne mürgisus. Kerged arengupeetuse tunnused koos selge mürgisuse nähtudega näitavad, et tegemist on tõenäoliselt mittespetsiifilise mürgise toimega. Muu kui kilpnäärmega seotud mürgisuse hindamine on uuringu oluline osa, kuna sellega vähendatakse valepositiivsete tulemuste tõenäosust. Ülemäärane suremus näitab selgelt, et olulised on muud mürgisuse mehhanismid. Samuti tähendab kasvu kerge vähenemine, mis tehakse kindlaks märgkaalu ja/või ninamiku-päraku vahemaa kaudu, et tegemist on muu kui kilpnäärmele suunatud mürgisusega. Kasvu ilmset suurenemist täheldatakse sageli kemikaalide puhul, mis mõjutavad normaalset arengut negatiivselt. Järelikult ei tähenda suuremad loomad tingimata, et tegemist on muu kui kilpnäärmele suunatud mürgisusega. Kilpnäärmele suunatud mürgisuse määramisel ei tohiks kunagi toetuda üksnes kasvule. Kilpnäärmele suunatud mürgisuse määramisel tuleks pigem kasutada kasvu koos arengustaadiumi ja kilpnäärme histopatoloogiaga. Ilmse mürgisuse kindlakstegemisel tuleks kaaluda ka muid näitajaid nagu turse, hemorraagilised haavandid, letargia, vähenenud söödatarbimine, korrapäratu/muutunud ujumisviis jne. Kui kõikidel uuritavatel kontsentratsioonidel avalduvad selge mürgisuse nähud, tuleks kemikaali uurida madalama kontsentratsiooni juures, et teha järeldus selle kohta, kas kemikaal võib mõjuda kilpnäärmele või mitte.

62. Statistiliselt oluline arengu pidurdumine muude selge mürgisuse nähtude puudumise korral näitab, et kemikaal mõjutab kilpnääret (on kilpnäärme antagonist). Tugevate statistiliste muutuste puudumise korral võivad seda järeldust toetada kilpnäärme histopatoloogia tulemused.

▼**M6**

Statistilised analüüsid

63. Andmete statistiline analüüs peaks eelistatavalt toimuma vastavalt korrale, mida on kirjeldatud dokumendis „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*" (Ökotoksilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsed meetodid. Rakendamisjuhend) (11). Kõikide pidevate kvantitatiivsete näitajate (tagajäseme pikkus, ninamiku-päraku vahemaa, märgkaal) puhul, kus doosi-toime sõltuvus on monotoonne, tuleks kemikaali olulise toime kindlakstegemiseks astmeliselt kohaldada Jonckheere'i-Terpstra testi.

64. Pidevate näitajate puhul, kus doosi-toime sõltuvus ei ole monotoonne, tuleks andmeid hinnata normaaljaotuse seisukohast (soovitatavalt Shapiro-Wilki või Anderson-Darlingi testiga) ja dispersiooni homogeensuse seisukohast (soovitatavalt Levene'i testiga). Mõlemad testid tehakse ANOVA analüüsi jääkidega. Normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse formaalsete testide asemel võib kasutada ka eksperthinnangut, kuid formaalseid teste tuleb eelistada. Kui selgub, et tegemist ei ole normaaljaotusega või dispersioon on heterogeenne, tuleks otsida normaliseeriv, dispersiooni stabiliseeriv teisendus. Kui andmed (võib-olla pärast teisendust) on normaaljaotusega ja dispersioon on homogeenne, leitakse oluline kemikaaliga kokkupuute mõju Dunnetti testiga. Kui andmed (võib-olla pärast teisendust) on normaaljaotusega, kuid dispersioon on heterogeenne, leitakse oluline kemikaaliga kokkupuute mõju Tamhane'i-Dunnetti või T3-testiga või Mann-Whitney-Wilcoxoni U-testiga. Kui ei õnnestu leida normaliseerivat teisendust, leitakse oluline kemikaaliga kokkupuute mõju Mann-Whitney-Wilcoxoni U-testiga, kasutades p-väärtuste kohandamist Bonferroni-Holmi järgi. Dunnetti testi kasutatakse sõltumatult ANOVA F-testist ja Mann-Whitney testi kasutatakse sõltumatult Kruskall-Wallise testist.

65. Olulist suremust ei eeldata, kuid seda tuleks hinnata astmelise Cochran-Armitage'i testiga, kui andmed on kooskõlas doosi-toime vahelise monotoonse sõltuvusega; vastupidisel juhul tuleks teha Fisheri täpne test Bonferroni-Holmi kohandusega.

66. Seda, kas kemikaaliga kokkupuude avaldab olulist mõju arengustaadiumile, kontrollitakse Jonckheere'i-Terpstra testi astmelise rakendamisega paralleelkatsete mediaanidele. Teise võimalusena ja eelistatavalt tuleks mõju kindlakstegemiseks kasutada multikvantaalset Jonckheere'i testi 20. kuni 80. protsentiilini, kuna selles võetakse arvesse jaotusprofiili muutusi.

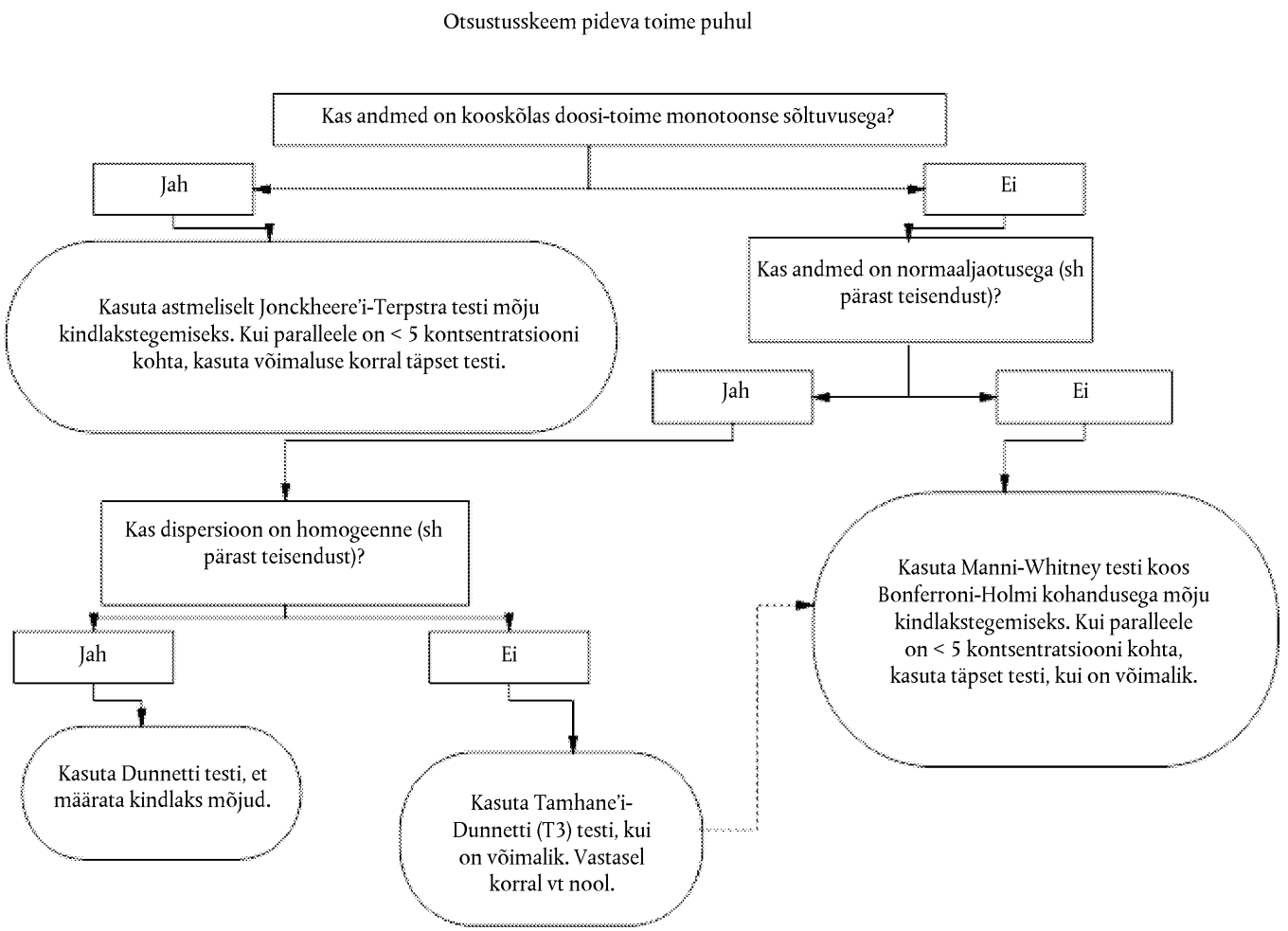
67. Sobiv analüüsiüksus on paralleelkatse, nii et andmed kujutavad endast paralleelkatsete mediaane, kui kasutatakse Jonckheere'i-Terpstra või Mann-Whitney U-testi või paralleelkatsete keskväärtusi, kui kasutatakse Dunnetti testi. Doosi-toime monotoonsust võib hinnata visuaalselt kokkupuute- ja paralleelrühmade keskväärtuste või mediaanide põhjal või formaalsete testidega, nagu on kirjeldatud eespool (11). Vähem kui viie paralleelkatse puhul ühe kokkupuutetaseme või kontrolli kohta tuleks kasutada Jonckheere'i-Terpstra ja Mann-Whitney testide täpse permutatsiooni versioone, kui need on kättesaadavad. Kõikide osutatud testide statistilist olulisust hinnatakse olulisusnivoo 0,05 juures.

68. Joonisel 4 on esitatud pideva toime andmete statistiliste testide tegemise otsustamisskeem.

▼M6

Joonis 4.

Pidevale toimele osutavate andmete statistiliste töötluste otsustamisskeem.



02008R0440 — ET — 16.10.2019 — 008.001 — 2222

▼M6

Konkreetsed kaalutlused andmete analüüsi puhul

Ebaõnnestunud kokkupuutetasemekatsete kasutamine

69. Kui otsustatakse, et kas ühe paralleelkatse või terve kokkupuutetaseme puhul võib avalduda selge mürgisus ja see tuleks analüüsist kõrvale jätta, tuleb arvestada mitut tegurit. Selge mürgisus on määratletud rohkem kui kahe surmajuhtumiga ühes paralleelkatses, mida saab panna üksnes mürgisuse arvele ja mis ei saa olla tingitud tehnilisest veast. Muud selge mürgisuse nähud on järgmised: veritsemine, ebatavaline käitumine, ebatavaline ujumisviis, isutus ja muud kliinilised haigustunnused. Subletaalse mürgisuse puhul võib olla vajalik kvalitatiivne hindamine; selle tegemisel peaks alati olema aluseks võrdlemine puhta vee kontrollrühmaga.

Lahusti kontrollkatsed

70. Lahusti kasutamist tuleks kaaluda ainult viimase abinõuna, kui kõik muud kemikaali lisamise võimalused on läbi vaadatud. Kui kasutatakse lahustit, tuleb samal ajal teha kontrollkatse puhta veega. Katse lõpetamisel tuleb hinnata lahusti võimalikku mõju. Seda tehakse lahusti kontrollrühma ja puhta vee kontrollrühma statistilise võrdlemisega. Kõige asjakohasemad näitajad, mida tuleks sellise analüüsi juures arvesse võtta, on arengustaadium, ninamiku-päraku vahekaugus ja märgkaal, kuna neid võib mõjutada muu kui kilpnäärmega seotud mürgisus. Kui nende näitajate vahel tuvastatakse statistiliselt olulisi erinevusi vee kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma vahel, määratakse uuringu eesmärgiks olevad näitajad mõõdetud toime võrdlusest puhta vee kontrollrühmaga. Kui mõõdetud muutujate puhul puudub statistiliselt oluline erinevus puhta vee kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma vahel, määratakse uuringu eesmärgiks olevad näitajad mõõdetud toime võrdlusest lahjendusvee ja lahusti kontrollrühmade ühendatud tulemustega.

Kokkupuude kemikaaliga rühmade puhul, kes jõuavad 60. või kõrgema arengustaadiumini

71. Pärast 60. arengustaadiumi hakkab kulleste suurus ja mass vähenema kudede resorptsiooni ja absoluutse veesisalduse vähenemise tõttu. Märgkaalu ja ninamiku-päraku vahemaa mõõtmisi ei sobi seetõttu enam kasutada kasvukiiruste statistilises analüüsis. Seepärast tuleks märgkaalu ja pikkuse andmed selliste loomade puhul, kes jõuavad Nieuwkoopi ja Faberi arengustaadiumi üle 60, jätta välja; neid ei tohiks kasutada paralleelkatsete keskväärtuste või mediaanide analüüsis. Selliste kasvuga seotud näitajate analüüsil võib kasutada kahte erinevat lähenemisviisi.

72. Üks lähenemisviis on võtta märgkaalu ja ninamiku-päraku vahemaa statistilistes analüüsides arvesse vaid kulleseid arengustaadiumiga kuni 60. Arvatakse, et see lähenemisviis annab piisavalt usaldusväärseid andmeid võimaliku mõju kohta kasvule, kui analüüsidest jäetakse välja üksnes väike osa (≤ 20 %) katseloomadest. Kui rohkem kulleseid (≥20 %) on ühel või mitmel nimikontsentratsioonil jõudnud arengus 60. staadiumist kaugemale, tuleks kõikide kulleste puhul kasutada kahefaktorilist ANOVAd, millesse on pesastatud dispersioonistruktuur, et hinnata kemikaaliga kokkupuutest tingitud mõju kasvule, võttes arvesse hiliste arengustaadiumide mõju kasvule. 3. liites on esitatud suunised massi ja pikkuse andmete kahefaktorilise ANOVA analüüsi tegemiseks.

KIRJANDUS

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris

(4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelpia, PA

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551

(8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris

(10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

▼**M6**

1. liide

Tabel 1.

Kahepaiksete metamorfoosi 21-päevase katse tingimused

Katseloomad		*Xenopus laevis*'e vastsed (kullesed)	
Vastsete arengustaadium katse alguses		51. arengustaadium Nieuwkoopi ja Faberi järgi	
Kokkupuuteaeg		21 päeva	
Kulleste valiku kriteeriumid		Arengustaadium ja kogupikkus (valikuline)	
Katses kasutatavad kontsentratsioonid		Vähemalt 3 kontsentratsiooni ligikaudu ühe suurusjärgu vahemikus	
Kokkupuuterežiim		Läbivooluga (eelistatud) ja/või staatiline uuendussüsteem	
Voolukiirus katsesüsteemis		25 ml/min (täielik koguse asendamine ligikaudu iga 2,7 tunni jooksul)	
Peamised määratavad näitajad / määramise päev		Suremus	Iga päev
		Arengustaadium	7. ja 21. päev
		Tagajäseme pikkus	7. ja 21. päev
		Vahemaa ninamikust kuni pärakuavani	7. ja 21. päev
		Keha märgmass	7. ja 21. päev
		Kilpnäärme histoloogia	21. päev
Lahjendamiseks kasutatav vesi / laboratoorne kontroll		Aktiivsöel filtrimisega kloorist puhastatud kraanivesi või muu samaväärne laboris kasutatav vesi	
Kulleste tihedus		20 kullest katsenõus (5 kullest liitri kohta)	
Uuritav lahus / katsenõu		4–10 l nõu (veekiht vähemalt 10–15 cm) / klaasist või roostevabast terasest nõu (nt 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Paralleelkatsed		4 paralleelkatsetega katsenõu uuritava kontsentratsiooni ja kontrolli kohta	
Lubatav suremuse määr kontrollrühmades		≤ 10 % igas paralleelkatsenõus	
Kilpnäärme fikseerimine	Fikseeritavate kilpnäärmete arv	Kõik kullesed (algselt hinnatakse 5 kullest paralleelkatse kohta)	
	Piirkond	Pea või kogu keha	
	Fikseerimisvedelik	Davidsoni fikseerimislahus	
Söötmine	Sööt	Sera Micron® või samaväärne	
	Kogus / sagedus	Vt tabel 1, kui kasutatakse sööta Sera Micron®	
Valgustus	Valgustusperiood	12 tundi valgust – 12 tundi pimedust	

▼**M6**

	Valgustuse intensiivsus	600 kuni 2 000 luksi (mõõdetuna vee pinnal)
Vee temperatuur		22 ± 1 °C
pH		6,5–8,5
Lahustunud hapniku sisaldus (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % õhu küllastuskontsentratsioonist)
Analüütilise keemia proovide võtmise ajakava		Üks kord nädalas (4 proovivõtmist katse kohta)

▼M6

2. liide

Tabelid lähteandmete ja koondandmete esitamiseks

Tabel 1.

Üldine teave uuritava kemikaali kohta

Keemilised andmed			
	Sisestage uuritav kemikaal, kontsentratsiooni ühikud ja kokkupuutekontsentratsioonid		
	Uuritav kemikaal:		
	Kontsentratsiooni ühik:		
	Kokkupuutekontsentratsioon 1		
	Kokkupuutekontsentratsioon 2		
	Kokkupuutekontsentratsioon 3		
	Kokkupuutekontsentratsioon 4		
	Kuupäev (0-päev):		Märkida kuupäev (pp/kk/aa)
	Kuupäev (7. päev):		Märkida kuupäev (pp/kk/aa)
	Kuupäev (21. päev):		Märkida kuupäev (pp/kk/aa)

Tabel 2.

Tabelid lähteandmete kogumiseks 7. ja 21. päeval

PÄEV X
KUUPÄEV 00/00/00

	Kontsentratsioon	Kokkupuuterühma number	Paralleelkatse number	Isendi number	Isendi tunnus	Arengustaadium	Ninamikupärakuava vahemaa (mm)	Tagajäseme pikkus (mm)	Kogu organismi märgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
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							

▼**M6**

	Kontsentratsioon	Kokkupuuterühma number	Paralleelkatse number	Isendi number	Isendi tunnus	Arengustaadium	Ninamikupärakuava vahemaa (mm)	Tagajäseme pikkus (mm)	Kogu organismi märgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
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							

▼**M6**

	Kontsentratsioon	Kokkupuuterühma number	Paralleelkatse number	Isendi number	Isendi tunnus	Arengustaadium	Ninamikupärakuava vahemaa (mm)	Tagajäseme pikkus (mm)	Kogu organismi märgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
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							

▼**M6**

	Kontsentratsioon	Kokkupuuterühma number	Paralleelkatse number	Isendi number	Isendi tunnus	Arengustaadium	Ninamikupärakuava vahemaa (mm)	Tagajäseme pikkus (mm)	Kogu organismi märgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
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							

▼**M6**

Tabel 3.

Uuritavate näitajate 7. ja 21. päeva andmetest arvutatud koondtulemused

		Arengustaadium			Ninamiku-pärakuava vahemaa (mm)		Tagajäseme pikkus (mm)		Mass (mg)	
Konts.	Parall.	MIN	Mediaan	MAX	Keskmine	Std-hälve	Keskmine	Std-hälve	Keskmine	Std-hälve
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Märkus: arvutused lahtrites on seotud tabelisse 2 sisestatud andmetega.

Tabel 4.

Igapäevased suremuse andmed

Katsepäev	Kuupäev	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Katsepäev	Kuupäev	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Arv paralleelkatses		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arv kokkupuuteta-seme kohta		0				0				0				0			

Märkus: arvutused lahtrites on seotud tabelisse 1 sisestatud andmetega.

Tabel 5.

Vee kvaliteedi kriteeriumid

Kokkupuutesüsteem (läbivooluga / staatiline uuendatav):
Temperatuur:
Valguse intensiivsus:
Valguse-pimeduse tsükkel:
Sööt:
Söötmismäär:
Vee pH
Joodi kontsentratsioon katsevees:

▼**M6**

Tabel 6.

Keemiaandmete koondtabel

Kemikaali nimetus:																					
CASi nr:																					
Katsepäev	Kuupäev	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Märkus: arvutused lahtrites on seotud tabelisse 1 sisestatud andmetega.

▼**M6**

Tabel 7.

Tabel histopatoloogiliste leidude esitamiseks põhikriteeriumide järgi

Kuup äev: Keemiline aine: Patoloog:

Kontroll-looma ID – paralleelkatse 1	Kontroll-looma ID – paralleelkatse 2	Kilpnäärme hüpertroofia	Kilpnäärme atroofia	Follikulaarrakkude hüpertroofia	Follikulaarrakkude hüperplaasia
Kokku:					

Doosilooma ID – paralleelkatse 1	Doosilooma ID – paralleelkatse 2	Kilpnäärme hüpertroofia	Kilpnäärme atroofia	Follikulaarrakkude hüpertroofia	Follikulaarrakkude hüperplaasia
Kokku:					

Doosilooma ID – paralleelkatse 1	Doosilooma ID – paralleelkatse 2	Kilpnäärme hüpertroofia	Kilpnäärme atroofia	Follikulaarrakkude hüpertroofia	Follikulaarrakkude hüperplaasia
Kokku:					

▼**M6**

Tabel 8.

Täiendavad histopatoloogilised kriteeriumid

Kuupäev: Keemiline aine: Patoloog:

Kontroll-looma ID – paralleelkatse 1	Kontroll-looma ID – paralleelkatse 2	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Kokku:			

Doosilooma ID – paralleelkatse 1	Doosilooma ID – paralleelkatse 2	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Kokku:			

Doosilooma ID – paralleelkatse 1	Doosilooma ID – paralleelkatse 2	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Kokku:			

Doosilooma ID – paralleelkatse 1	Doosilooma ID – paralleelkatse 2	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Kokku:			

▼**M6**

Tabel 9.

Histopatoloogiliste leidude jutustavad kirjeldused

Kuupäev:

Keemiline aine:

Patoloog:

		Jutustav kirjeldus
Kontroll-looma ID – paralleelkatse 1		
Kontroll-looma ID – paralleelkatse 2		
Doosilooma ID – paralleelkatse 1		
Doosilooma ID – paralleelkatse 2		

▼**M6**

Doosilooma ID – paralleelkatse 1		
Doosilooma ID – paralleelkatse 2		
Doosilooma ID – paralleelkatse 1		
Doosilooma ID – paralleelkatse 2		

▼M6

Tabel 10.

Kahepaiksete metamorfoosi katse protokolli koondtabeli vorm päeva X jaoks (7. või 21. päev).

KV – mõõdetud kontsentratsiooni varieerumine

		Kontroll				Doos 1					Doos 2					Doos 3				
Näitaja	Paralleelkatse	Keskmine	St-hälve	KV	N	Keskmine	St-hälve	KV	N	p-väärtus	Keskmine	St-hälve	KV	N	p-väärtus	Keskmine	St-hälve	KV	N	p-väärtus
Tagajäseme pikkus (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskmine:																			
Ninamiku-pärakuava vahemaa (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskmine:																			
Märgmass (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskmine:																			

▼M6

Tabel 11.

Kahepaiksete metamorfoosi katse protokolli arengustaadiumi andmete koondtabeli vorm päeva X jaoks (7. või 21. päev)

		Kontroll				Doos 1					Doos 2					Doos 3				
	Paralleelkatse	Mediaan	Minimaalne	Maksimaalne	N	Mediaan	Minimaalne	Maksimaalne	N	p-väärtus	Mediaan	Minimaalne	Maksimaalne	N	p-väärtus	Mediaan	Minimaalne	Maksimaalne	Mediaan	p-väärtus
Arengustaadium	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskmine:																			

▼M6

3. liide

Massi ja pikkuse alternatiivne analüüs, kui hilisesse arengustaadiumi jõuab ühel või mitmel kontsentratsioonil üle 20 % kullestest

Kui paljud kullesed (≥ 20 %) on ühel või mitmel nominaalsel kontsentratsioonil jõudnud arengus kaugemale kui 60. staadiumini, tuleks kõikide kulleste puhul kasutada kahetegurilist ANOVAd, millesse on pesastatud dispersioonistruktuur, et hinnata kemikaaliga kokkupuutest tingitud mõjusid kasvule, võttes arvesse hiliste arengustaadiumide mõju kasvule.

Ettepanek on kasutada kõiki andmeid, kuid võtta arvesse hiliste arengustaadiumide mõju. Seda saab teha kahetegurilise pesastatud dispersioonistruktuuriga ANOVA abil. Muutuja LateStage väärtuseks võetakse JAH looma puhul, kelle arengustaadium on 61 või hilisem. Vastasel juhul võetakse LateStage väärtuseks EI. Seejärel saab teha kahetegurilise ANOVA, mille tegurid on kontsentratsioon ja LateStage ja nende vastastikune toime, milles Rep(Conc) on üks juhuslik tegur ja Kulles(REP) on teine juhuslik mõju. Sellega käsitletakse paralleelkatset (REP) analüüsi üksusena ja see annab sisuliselt sama tulemuse kui REP*latestage keskväärtuste kaalutud analüüs, milles kaaludena on kasutatud loomade arvu iga keskväärtuse kohta. Kui andmed on vastuolus ANOVA normaaljaotuse või dispersiooni homogeensuse nõuetega, võib teha normeeritud astakteisenduse selle takistuse kõrvaldamiseks.

Lisaks standardsele ANOVA F-testile kontsentratsiooni, LateStage'i ja nende vastastikuse toime mõju selgitamiseks, võib vastastikuse toime F-testi jagada kaheks täiendavaks ANOVA F-testiks, ühe võib teha toime keskväärtustega kõigi kontsentratsioonide puhul, kus LateStage = EI ja teise toime keskväärtustega kõigi kontsentratsioonide puhul, kus LateStage = JAH. Edasised kontsentratsioonirühmade keskmiste võrdlused kontrollrühmade keskmistega tehakse iga LateStage arengustaadiumi jaoks. Võib teha trendi leidmise tüüpi analüüsi, kasutades sobivaid kontraste, või lihtsalt paariviisi võrrelda, kui on tõendeid, et LateStage'i muutuja tasandil võib esineda mittemonotoonne doosi-toime sõltuvus. p-väärtuste kohandus Bonferroni-Holmi järgi tehakse ainult siis, kui vastav F-testi osa ei ole oluline. Seda saab teha statistikaprogrammi SAS ja tõenäoliselt ka muude tarkvarapakettide abil. Probleemid võivad tekkida siis, kui teatavate kontsentratsioonide puhul ei ole hilises arengujärgus loomi, kuid selliseid olukordi on lihtne lahendada.

▼**M6**

4. liide

Mõisted

Kemikaal – aine või segu.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M6

C.39. HOOGHÄNNALISTE MULLAS PALJUNEMISE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 232 (2009). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata kemikaalide mõju hooghännaliste sigivusele mullas. Selle aluseks on olemasolevad meetodid (1, 2). Neitsissigiv *Folsomia candida* ja suguliselt sigiv *Folsomia fimetaria* on kaks kõige kättesaadavamat hooghännaliste liiki; neid saab kasvatada ja need on kaubanduslikult kättesaadavad. Kui tuleb hinnata konkreetseid elupaiku, kus neid kaht liiki ei esine, saab käesolevat katse-eeskirja laiendada ka muudele hooghännaliste liikidele, kui need täidavad uuringu nõuetekohasuse kriteeriume.

2. Mullas elavad hooghännalised on ökotoksikoloogiliste katsete puhul ökoloogiliselt asjakohased loomad. Hooghännalised on kuuejalgsed, kellel on õhuke eksoskelett, mis laseb kergesti läbi õhku ja vett; nad on lülijalgsed, kelle kemikaalidega kokkupuute tee ja määr on teistsugused kui vihmaussidel ja valgeliimuklastel.

3. Hooghännaliste asustustihedus mullas ja lehekõdu kihtides ulatub paljudes maismaaökosüsteemides tavaliselt 10^5 isendini m^2 kohta (3, 4). Täiskasvanud looma pikkus on tavaliselt 0,5–5 mm, nende panus pinnases elavate loomade summaarsesse biomassi ja hingamisse on madal, hinnanguliselt 1–5 % (5). Nende kõige olulisem osa võib seepärast seisneda mulla protsesside reguleerimises, kuna nad toituvad mikroobidest ja on mikrofauna röövloomad. Hooghännalised on saakloomad paljude mullas ja selle pinnal elavate selgrootute jaoks nagu lestad, sajajalgsed, ämblikud, jooksiklased ja lühitiiblased. Hooghännalised aitavad kaasa lagunemisprotsessidele happelises mullas, kus nad võivad osutuda kõige olulisemateks selgrootuteks valgeliimuklaste kõrval, kuna vihmausse ja tuhatjalgseid seal tavaliselt ei ole.

4. *F. fimetaria* on levinud üle kogu maailma ja on tavaline mitmes mullatüübis liivmuldadest liivsavimuldadeni ja kõdumullast huumusmullani. See on silmadeta ja pigmendita hooghännaline. Teda on leitud põllumajanduslikust pinnasest kogu Euroopas (6). Ta on kõigesööja, sööb muu hulgas seeneniite, baktereid, algloomi ja detriiti. Toitumise kaudu puutub ta kokku taimede seenhaiguste tekitajatega (7) ja võib mõjutada seeneniidistikku, nagu on teada *F. candida* kohta. Nagu enamik hooghännalisi, paljuneb ta suguliselt, seepärast peavad alati kohal olema isasloomad munade viljastamiseks.

5. Ka *F. candida* on levinud kogu maailmas. Kuigi ta ei ole tavaline enamikus looduslikest muldadest, esineb teda väga rohkearvuliselt huumusrikastes kohtades. See on silmadeta ja pigmendita hooghännaline. Tal on hästi arenenud *furca* (hüppamisorgan, hark), ta jookseb aktiivselt ja on häirimise korral kohe valmis hüppama. *F. candida* ökoloogiline roll on sarnane *F. fimetaria* omale, kuid tema elupaigaks on rohke orgaanilise aine sisaldusega muld. *F. candida* paljuneb neitsissigimisega. Isasloomi esineb harvemini kui üks tuhande kohta.

KATSE PÕHIMÕTE

6. Sünkroonsed täiskasvanud (*F. fimetaria*) või noorjärgus (*F. candida*) hooghännalised viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaali mitme kontsentratsiooniga; kemikaal on segatud kunstlikku pinnasesse (8), mille puhul kasutatakse 5 % orgaanilise aine sisaldust (või mingisse muusse pinnasesse). Katse käigu võib jagada kahte etappi:

— doosipiirkonna määramise katse, kui ei ole piisavalt teavet mürgisuse kohta; katses määratakse kaks peamist näitajat, suremus ja paljunemine,

▼M6

mida hinnatakse pärast 2 nädalat *F. fimetaria* ja 3 nädalat *F. candida* puhul;

— paljunemise põhikatse, millega hinnatakse vanemloomadest saadavate noorloomade arvu ja vanemate ellujäämist. Selle põhikatse kestus on 3 nädalat *F. fimetaria* või 4 nädalat *F. candida* puhul.

Uuritava kemikaali mürgised mõjud täiskasvanute suremusele ja sigivusele väljendatakse LC_x ja EC_x kujul, mille leidmiseks töödeldakse andmeid sobiva mittelineaarse regressiooniga, et leida kontsentratsioon, mis põhjustab loomadel x % isendite surma või sigivuse vähenemise x %, või alternatiivina NOEC/LOEC väärtusena (9).

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

7. Oleks hea eelnevalt teada uuritava kemikaali füüsikalisi omadusi, vees lahustuvust, log K_{ow} väärtust, pinnases oleva vee ja pinnase vahel jaotumise koefitsienti ja aururõhku. Soovitatav oleks teada, mis juhtub uuritava kemikaaliga pinnases, näiteks fotolüüsi ja hüdrolüüsi ning biolagunemise kiirust. Protokolli tuleks kanda uuritava kemikaali keemiline nimetus IUPACi nomenklatuuri järgi, CASi number, partii, saadetis, struktuurivalem ja puhtus, kui need on kättesaadavad.

8. Käesolevat katsemeetodit võib kasutada nii vees lahustuvate kui ka lahustumatute kemikaalide puhul. Uuritava kemikaaliga kokkupuutesse viimise meetod on kummalgi juhul siiski erinev. Katsemeetod ei ole kohaldatav lenduvatele kemikaalidele, s.t kemikaalidele, mille Henry konstant või õhu/vee jaotuskoefitsient on suurem kui 1, või kemikaalidele, mille aururõhk temperatuuril 25 °C on suurem kui 0,0133 Pa.

KATSE NÕUETEKOHASUS

9. Järgmised kriteeriumid kemikaaliga mitte kokku puutunud kontrollrühmade puhul peaksid olema täidetud selleks, et katse tulemusi saaks lugeda nõuetekohaseks:

— täiskasvanud isendite suremus ei ületa katse lõpuks 20 %;

— noorte keskmine arv nõus peaks katse lõpus olema vähemalt 100;

— noorloomade arvu jaoks arvutatud dispersioon peaks olema väiksem kui 30 % põhikatse lõpus.

VÕRDLUSKEMIKAAL

10. Katse jaoks valitud mullatüübi puhul tuleks teha katseid võrdluskemikaaliga selle kontsentratsioonil EC_{50} kas korrapäraste ajavahemike järel või igas uuritava kemikaaliga tehtavas katses; sellega kontrollitakse, et katsesüsteemis reageerivad uuritavad loomad kemikaalile normaalselt. Sobiv võrdluskemikaal on boorhape, mis peaks kontsentratsioonil ligikaudu 100 mg mulla kuivmassi kg kohta (10, 11) vähendama mõlema liigi paljunemist 50 %.

KATSE KIRJELDUS

Katsenõud ja seadmed

11. Sobiv katsenõu on selline, milles saab hoida 30 g niisket pinnast. Nõu materjal peab olema klaas või inertne plastik (mitte mürgine). Plastiknõude kasutamist tuleks siiski vältida, kui loomade kokkupuude uuritava kemikaaliga selles väheneb, kuna kemikaal sorbeerub nõule. Katsenõu ristlõike

▼M6

pindala peaks olema selline, et tegelik pinnase sügavus nõus on 2–4 cm. Nõud peaksid olema kaanega (nt klaasist või polüetüleenist), ning kaas peaks olema selline, mis vähendab vee aurustumist, kuid võimaldab gaaside vahetust pinnase ja õhu vahel. Nõu peaks olema vähemalt osaliselt läbipaistev, et sellesse pääseks valgus.

12. Vaja on harilikku laborivarustust, eeskätt järgmisi vahendeid:

— kuivatuskapp;

— stereomikroskoop;

— pH-meeter ja luksmeeter;

— sobiv täpne kaal;

— temperatuuri reguleerimiseks vajalik varustus;

— asjakohased seadmed õhuniiskuse kontrolli all hoidmiseks (ei ole kohustuslikud, kui nõud on kaetud kaanega);

— reguleeritava temperatuuriga inkubaator või väike ruum;

— pintsetid või õhuvooluga töötav imemisseade.

Katses kasutatava pinnase ettevalmistamine

13. Katses kasutatakse modifitseeritud tehismulda, mille orgaanilise aine sisaldus on 5 % (8). Teise võimalusena võib kasutada looduslikku mulda, kuna tehismuld ei sarnane loodusliku mullaga. Tehismulla soovitatav koostis on järgmine (väljendatud kuivmassina, kuivatatud 105 °C juures püsiva massini):

— 5 % *Sphagnum*-turvast, kuivatatud õhu käes ja peeneks jahvatatud (lubatud on osakese suurus 2 ± 1 mm);

— 20 % kaoliinsavi (kaoliniidisisaldus eelistatavalt üle 30 %);

— ligikaudu 74 % õhukuiva tööstuslikku liiva (olenevalt vajalikust $CaCO_3$ kogusest), valdavalt peen liiv, milles üle 50 % osakestest on vahemikus 50–200 mikronit. Liiva täpne kogus sõltub $CaCO_3$ kogusest (vt allpool); kokku peaksid nad moodustama 75 %;

— 1,0 % kaltsiumkarbonaati (pulbriline $CaCO_3$, analüütiliselt puhas), et viia pH vahemikku 6,0 ± 0,5; lisatava kaltsiumkarbonaadi kogus võib sõltuda peamiselt turba kvaliteedist ja laadist (vt märkus 1).

Märkus 1: vajalik $CaCO_3$ kogus sõltub pinnase substraadi komponentidest ja see tuleks määrata eelinkubeeritud niiske pinnase osaproovide pH määramisega vahetult enne katset.

Märkus 2: soovitatav on mõõta pH ja soovi korral ka C/N suhe, katioonivahetuse mahtuvus (*Cation Exchange Capacity*, CEC) ja orgaanilise aine sisaldus pinnases, et võimaldada nende normaliseerimist hilisemas etapis ja tulemuste paremat tõlgendamist.

Märkus 3: vajaduse korral, näiteks eriotstarbelise katse korraldamisel, võib katses ja/või kasvusubstraadina kasutada ka looduslikku pinnast saastumata kohtadest. Kui kasutatakse looduslikku mulda, tuleb seda iseloomustada, esitada vähemalt päritolu (võtmise koht), pH, tekstuur (osakeste suurusjaotus), katioonivahetuse mahutavus (*cation exchange capacity*, CEC) ja orgaanilise aine sisaldus ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid. Loodusliku mulla puhul on soovitatav näidata selle sobivust katse jaoks ja katse nõuetekohasuse kriteeriumide täitmist enne põhikatse tegemist.

▼M6

14. Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (näiteks suuremahulises laborisegistis). Tehismulla maksimaalne veemahutavus määratakse 5. liites esitatud meetodiga. Katses kasutatava pinnase niiskusesisaldus tuleks optimeerida, et saavutada kohev poorne mulla struktuur, mis võimaldab hooghännalistel pooridesse siseneda. See on tavaliselt 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest.

15. Kuiv tehismuld tehakse 2–7 päeva enne katse alustamist niiskeks, et tasakaalustada/stabiliseerida happesust; selleks lisatakse piisav kogus deioniseeritud vett, et saada ligikaudu pool lõplikust veesisaldusest. pH määramiseks kasutatakse mulla ja 1 M kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M kaltsiumkloriidi ($CaCl_2$) lahuse segu suhtega 1:5 (vt 6. liide). Kui pinnas on nõutavast happelisem, võib seda reguleerida vajaliku koguse $CaCO_3$ lisamisega. Kui pinnas on liiga aluseline, saab seda reguleerida mõne hooghännaliste jaoks kahjutu anorgaanilise happe lisamisega.

16. Eelnevalt niisutatud muld jagatakse nii mitmeks osaks, kui palju on uuritavaid kemikaali (ja vajaduse korral võrdluskemikaali) kontsentratsioone ja kontrollrühmi, mida kasutatakse katses. Lisatakse uuritav kemikaal ja mulla niiskusesisaldus reguleeritakse vastavalt punktile 24.

Katsealuste loomade valimine ja ettevalmistamine

17. Soovitatav liik on neitsissigiv hooghännaline *F. candida*, kuna käesoleva meetodi võrdleval katsetamisel eri laborites (11) vastasid ellujäämise tulemused selle liigi korral sagedamini nõuetekohasuse kriteeriumidele kui *F. fimetaria* puhul. Kui kasutatakse muud liiki, peaks see vastama punktis 9 esitatud nõuetekohasuse kriteeriumidele. Katse alguses peaksid katseloomad olema hästi söödetud ja nende vanus peaks olema vahemikus 23–26 päeva *F. fimetaria* ja 9–12 päeva *F. candida* puhul. Igas paralleelkatsenõus tuleks kasutada *F. fimetaria* puhul 10 isas- ja 10 emaslooma ning *F. candida* puhul 10 emaslooma (vt 2. ja 3. liide). Sünkroonsed loomad võetakse nõudest juhuvalikuga ning nende tervislikku ja füüsilist seisundit kontrollitakse iga paralleelkatsetes kasutatava partii puhul. Kõik 10 või 20 isendist koosnevad rühmad viiakse üle juhuslikkuse alusel valitud katseanumatesse ning suured *F. fimetaria* emasloomad valitakse selliselt, et neid saaks korralikult eristada *F. fimetaria* isasloomadest.

Uuritavate kontsentratsioonide valmistamine

18. Uuritavat kemikaali võib manustada nelja meetodiga: 1) kemikaal segatakse pinnasesse, kasutades kandeainena vett, 2) kemikaal segatakse pinnasesse, kasutades kandeainena orgaanilist lahustit, 3) kemikaal segatakse pinnasesse, kasutades kandeainena liiva, või 4) kemikaal kantakse mulla pinnale. Sobiva meetodi valik sõltub kemikaali omadustest ja katse eesmärgist. Üldiselt soovitatakse uuritav kemikaal segada mulla sisse. Vajalik võib olla siiski eelistada sellist manustamisviisi, mis on kooskõlas uuritava kemikaali praktilise kasutamisega (näiteks vedelikvormi pihustamine või eriliste pestitsiidivormide, nagu graanulid või seemnete puhtimislahused, kasutamine). Pinnast töödeldakse enne hooghännaliste lisamist, välja arvatud juhul, kui uuritav kemikaal kantakse mulla pinnale – sel juhul tuleks hooghännalistel lasta enne tungida pinnasesse.

Vees lahustuv uuritav kemikaal

19. Valmistatakse piisav kogus uuritava kemikaali lahust deioniseeritud vees, millest piisab ühe uuritava kontsentratsiooni kõikide paralleelkatsete loomiseks. Iga uuritava kemikaali lahust segatakse põhjalikult eelnevalt niisutatud mullaga, enne kui see viiakse katsenõusse.

Vees mittelahustuv uuritav kemikaal

20. Kui kemikaal ei lahustu vees, kuid lahustub orgaanilistes lahustites, võib uuritava kemikaali lahustada sobiva lahusti (nt atsetooni) võimalikult väikses koguses, mis veel võimaldab lahuse korraliku segamise mullaga, ja segada

▼M6

see vajaliku kvartsliivakogusega. Tuleks kasutada üksnes lenduvaid lahusteid. Kui kasutatakse orgaanilist lahustit, tuleb kõikide uuritavate kontsentratsioonide ja täiendava lahusti negatiivse kontrolli puhul lisada ühesugune minimaalne kogus lahustit. Nõud, millesse lahusti abil viidi uuritav kemikaal, tuleb jätta teatavaks ajaks ilma katteta, et uuritava kemikaali lisamiseks kasutatud lahusti saaks auruda; tuleb tagada, et mürgine kemikaal ei lenduks selle ajaga.

Uuritav kemikaal, mis lahustub halvasti vees ja orgaanilistes lahustites

21. Kui kemikaal lahustub halvasti vees ja orgaanilistes lahustites, segatakse uuritavat kemikaali kvartsliivaga, mis peaks olema osa pinnasesse lisatavast liivakogusest, et saada katseks vajalik kontsentratsioon. See kvartsliiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelnevalt niisutatud mullale ning segatakse sellega põhjalikult läbi pärast sobiva niiskusesisalduse saamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist. Lõplik segu jaotatakse katsenõudesse. Sama protseduuri korratakse iga uuritava aine kontsentratsiooni puhul ja samuti asjakohase kontrolli valmistamisel.

Uuritava kemikaali kandmine mulla pinnale

22. Kui uuritav kemikaal on pestitsiid, võib olla asjakohane kanda seda mulla pinnale pihustamise teel. Mulda töödeldakse pärast hooghännaliste lisamist. Katsenõud täidetakse kõigepealt niisutatud pinnasesubstraadiga, seejärel lisatakse katseloomad ja seejärel katsenõud kaalutakse. Selleks, et vältida loomade otsest kokkupuudet uuritava kemikaaliga, lisatakse viimane vähemalt pool tundi pärast hooghännaliste lisamist. Uuritav kemikaal tuleks kanda mulla pinnale võimalikult ühtlaselt, kasutades põllu töötlemise modelleerimiseks sobivat laboratoorset pihustusseadet. Pealekandmine peaks toimuma temperatuuridel, mille vahemik ei ületa ± 2 °C, ning vesilahuste, -emulsioonide või -dispersioonide puhul vee peale kandmise kiirusega, mis on kooskõlas riskihindamise soovitustega. Seda kiirust tuleks kontrollida, kasutades sobivat kaliibrimismeetodit. Erilisi pestitsiidivorme nagu graanulid või seemnete puhtimislahused tuleks peale kanda viisil, mis on kooskõlas põllumajandusliku kasutusega. Sööt lisatakse pärast pihustamist.

MÄÄRAMISE KÄIK

Katsetingimused

23. Katse keskmine temperatuur peaks olema 20 ± 1 °C temperatuuri vahemikus 20 ± 2 °C. Katse tehakse kontrollitavate valgustustsüklite režiimis (eelistatavalt 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust), valgustatus katsenõude piirkonnas 400 kuni 800 luksi.

24. Pinnase niiskuse kontrolli all hoidmiseks kaalutakse katsenõud katse alguses, keskel ja lõpus. Kaalu vähenemine > 2 % kompenseeritakse deioniseeritud vee lisamisega. Tuleb märkida, et veekadu saab vähendada kõrge õhuniiskuse sisaldusega (> 80 %) katseinkubaatoris.

25. pH-d mõõdetakse nii doosipiirkonna leidmise katse kui ka põhikatse alguses ja lõpus. Mõõtmised tuleb teha ühe täiendava kontrollkatse ja ühe täiendava kemikaalikatse (kõik kontsentratsioonid) jaoks valmistatud pinnaseproovidega, mis on valmistatud ja mida säilitatakse samal viisil kui uuritava ainega katsetes, kuid millele hooghännalisi ei lisata.

Katse käik ja mõõtmised

26. Iga uuritava kontsentratsiooni jaoks pannakse katsenõusse 30 g värsket uuritavat mulda. Samuti valmistatakse ette ka vee kontrollkatsed ilma uuritava kemikaalita. Kui uuritava kemikaali pealekandmiseks kasutatakse kandeainet,

▼M6

tuleks lisaks uuritava kemikaali seeriale teha ka üks kontrollseeria, mis sisaldab üksnes kandeainet. Lahusti või dispergaatori kasutamise korral peaks nende kontsentratsioon olema sama, mida kasutati uuritavat kemikaali sisaldavates nõudes.

27. Hooghännaliste üksikisendid viiakse hoolikalt üle igasse katsenõusse (mille vahel nad jaotatakse juhuvaliku alusel) ja paigutatakse mulla pinnale. Loomakesi saab tõhusamalt üle kanda õhuvooluga, kasutades nõrgatoimelist imemisseadet. Iga uuritava kontsentratsiooni ja kontrollrühmaga tehtavate paralleelkatsete arv sõltub katse kavandamisest. Katsenõud paigutatakse inkubaatorisse juhuslikult ja need paigutatakse iga nädal uuesti juhuslikkuse alusel ümber.

28. Igas *F. fimetaria*'ga tehtavas katses kasutatakse 20 täiskasvanut, 10 isas- ja 10 emaslooma (vanusega 23–26 päeva) katsenõu kohta. 21. päeval võetakse hooghännalised mullast välja ja loendatakse. Sünkroniseeritud loomade partiis eristatakse *F. fimetaria* isendeid soo järgi suuruse põhjal. Emasloomad on selgelt suuremad kui isasloomad (vt 3. liide).

29. Kui katse tehakse *F. candida*'ga, tuleks kasutada kümmet 9–12 päeva vanust noorlooma katsenõu kohta. 28. päeval võetakse hooghännalised mullast välja ja loendatakse.

30. Sobiva söödaallikana lisatakse katse alguses ja pärast umbes kahte nädalat igasse nõusse piisav kogus, nt 2–10 mg granuleeritud kuivatatud pagaripärmi, mida müüakse koduseks kasutamiseks.

31. Katse lõpus hinnatakse suremust ja paljunemist. Kolme nädala (*F. fimetaria*) või nelja nädala (*F. candida*) pärast võetakse hooghännalised katses kasutatud mullast välja (vt 4. liide) ja loendatakse (12). Hooghännaline loetakse surnuks, kui teda ei ole väljavõetute hulgas. Loomakeste väljavõtmise ja loendamise meetodid peavad olema valideeritud. Valideeritud meetodi puhul on noorloomade väljavõtmise tõhusus üle 95 %; näiteks viiakse neid selle määramiseks pinnasesse loetud arv.

32. Katse praktilise läbiviimise kokkuvõte ja ajakava on kirjeldatud 2. liites.

Katse kavandamine

Doosipiirkonna leidmise katse

33. Vajaduse korral tehakse doosipiirkonna leidmise katse, näiteks uuritava kemikaali viie kontsentratsiooniga, 0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg pinnase kuivmassi kg kohta, kasutades iga kokkupuutetaseme juures ja kontrollrühma puhul kaht paralleelkatset. Täiendav teave hooghännaliste suremuse või paljunemise kohta kas sarnaste kemikaalidega tehtud katsetest või kirjandusest võib aidata teha otsust doosipiirkonna määramise katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kohta.

34. Doosipiirkonna määramise katse kestus on kaks nädalat *F. fimetaria* ja kolm nädalat *F. candida* puhul, et tagada ühe põlvkonna järglaste saamine. Katse lõpus hinnatakse hooghännaliste suremust ja paljunemist. Tuleb registreerida täiskasvanute ja noorloomade arv.

Põhikatse

35. EC_x (nt EC_{10}, EC_{50}) määramiseks tuleb teha katse 12 kontsentratsiooniga. Soovitatav on teha vähemalt kaks paralleelkatset iga uuritava kontsentratsiooni juures ja kuus paralleelkatset kontrollrühmaga. Kontsentratsioonide vahekaugused võivad olla mitmesugused, sõltuvalt doosi ja toime seosest.

▼M6

36. Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) ja vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) leidmiseks tuleb kasutada vähemalt viit geomeetrilises reas olevat kontsentratsiooni. Soovitatav on teha neli paralleelkatset iga uuritava kontsentratsiooni juures ja lisaks kaheksa katset kontrollrühmaga. Kontsentratsioonide erinevused ei tohiks olla suuremad kui 1,8 korda.

37. Kombineeritud lähenemisviis võimaldab määrata nii NOEC/LOEC kui ka EC_x. Sellise kombineeritud lähenemisviisi puhul tuleks kasutada kaheksat kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatav on teha neli paralleelkatset iga uuritava kontsentratsiooni juures ja kaheksa katset kontrollrühmaga. Kontsentratsioonide erinevused ei tohiks olla suuremad kui 1,8 korda.

38. Kui doosipiirkonna määramise katses ei täheldata mingit mõju suurimal kontsentratsioonil (st 1 000 mg/kg juures), võib teha paljunemise katse piirsisalduskatsena, kasutades uuritava aine kontsentratsiooni 1 000 mg/kg ja kontrollrühma. Piirsisalduskatse annab võimaluse näidata, et piirkontsentratsiooni juures ei ole statistiliselt märkimisväärset mõju. Tuleb teha kaheksa paralleelkatset nii kemikaaliga töödeldud mullaproovidega kui ka kontrollrühmadega.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

39. Sigivus on peamine näitaja (nt saadud noorloomade arv katsenõu kohta). Statistilises analüüsis, näiteks ANOVA arvutustes, võrreldakse kemikaaliga töödeldud rühmade tulemusi Studenti t-testi, Dunnetti testi või Williamsi testi abil. Üksikute kontsentratsioonitasemete keskväärtuste jaoks arvutatakse 95 % usaldusvahemikud.

40. Ellujäänud täiskasvanud loomade arv kemikaaliga mõjutamata kontrollrühmades on üks peamisi katse nõuetekohasuse kriteeriume ja see tuleb dokumenteerida. Nagu doosipiirkonna määramise katse, nii ka põhikatse puhul tuleks lõpp-protokollis teatada ka kõik muud kahjulikkuse sümptomid.

LC_x ja EC_x

41. EC_x väärtused koos nendega seotud 95 % usaldusvahemiku ülemise ja alumise piiriga arvutatakse asjakohaste statistiliste meetoditega (nt logistiline või Weibulli funktsioon, kohandatud Spearman-Kärberi meetod või lihtne interpolatsioon). EC_x saadakse leitud võrrandisse väärtuse sisestamisega, mis vastab x %-le kontrollrühma keskväärtusest. EC_{50} või mõne muu EC_x arvutamiseks tuleb kõiki andmeid töödelda regressioonanalüüsiga. LC_{50} määratakse tavaliselt probitanalüüsi vms analüüsiga, milles võetakse arvesse suremusandmete binomiaaljaotust.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC)

42. Kui statistilise analüüsi eesmärk on määrata NOEC/LOEC, siis on vaja statistikat iga nõu kohta (iga üksik nõu on paralleelkatse). Tuleb kasutada vastavaid statistilisi meetodeid vastavalt OECD dokumendile 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" (Ökotoksilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsed meetodid. Rakendamisjuhend) (9). Üldiselt otsitakse andmetest uuritava kemikaali negatiivset mõju võrreldes kontrollrühmaga, kasutades selleks ühepoolse hüpoteesi testimist $p \leq 0,05$ juures.

43. Normaaljaotuse olemasolu ja dispersiooni homogeensust võib kontrollida asjakohase statistilise testiga, nt Shapiro-Wilki testi ja Levene'i testiga ($p \leq 0,05$). Võib teha ühesuunalise dispersioonanalüüsi (ANOVA) ja sellele järgnevad mitmese võrdluse testid. Mitmeseid võrdlusi (nt Dunnetti test) või

▼M6

sammuviisilise muutujate elimineerimise trendi teste (nt Williamsi test) saab kasutada selleks, et arvutada, kas esineb olulisi erinevusi ($p \leq 0,05$) kontrollrühmade ja uuritava kemikaali eri kontsentratsioonide vahel (soovitatav test valitakse vastavalt OECD dokumendile nr 54 (9)). Teiselt poolt võib NOEC ja LOEC määramiseks kasutada mitteparameetrilisi meetodeid (nt Bonferroni U-testi vastavalt Holmi või Jonckheere'i-Terpstra trenditestile).

Piirsisalduskatse

44. Kui tehakse piirsisalduskatse (kontrollrühma võrreldakse uuritava kemikaali üheainsa kontsentratsiooni rühmaga) ja parameetrilise testimismeetodi nõuded (normaalsus, homogeensus) on täidetud, võib meetrilisi reaktsioone hinnata Studenti testiga (t-test). Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mittevõrdse hajumise t-testi (Welchi t-test) või mitteparameetrilist testi nagu Manni-Whitney U-test.

45. Oluliste erinevuste kindlakstegemiseks kontrollrühmade (kontroll ja lahusti kontroll) vahel võib iga kontrollrühma paralleelkatseid töödelda nii, nagu on kirjeldatud piirsisalduskatse puhul. Kui nende testidega ei leita olulisi erinevusi, võib kontrolli ja lahusti kontrolli paralleelkatsed kokku panna. Vastasel korral tuleb kõiki kemikaaliga töödeldud rühmi võrrelda lahusti kontrolliga.

Katseprotokoll

46. Katseprotokollis esitatakse vähemalt alljärgnev teave:

Uuritav kemikaal

— uuritava kemikaali nimetus, partii, saadetise ja CASi number, puhtus;

— uuritava kemikaali füüsikalis-keemilised omadused (nt log K_{ow}, lahustuvus vees, aururõhk, Henry konstant (H)) ja eelistatavalt teave selle kohta, mis juhtub uuritava kemikaaliga mullas, kui see on teada;

— kui katseid ei tehtud puhta kemikaaliga, tuleks täpsustada uuritava kemikaali koostis ja lisandid;

Katseloomad

— liigi nimetus ja loomade tarnija, kasvatustingimuste kirjeldus ja vanusevahemik;

Katsetingimused

— katseplaani ja läbiviimise kirjeldus;

— katsepinnase valmistamise üksikasjad; kui kasutatakse looduslikku mulda, siis selle üksikasjalik kirjeldus (võtmiskoht, ajalugu, osakeste suurusjaotus, pH, orgaanilise aine sisaldus);

— pinnase veemahutavus;

— kirjeldus, millist meetodit kasutati uuritava kemikaali viimiseks pinnasesse;

— katsetingimused: valguse intensiivsus, valgustustsüklite kestus, temperatuur;

— söötmisrežiimi kirjeldus, sööda tüüp ja kogus, mida katses kasutati, söötmisajad;

— mulla pH ja veesisaldus katse alguses ja lõpus (kontrollnõudes ja igal uuritud kontsentratsioonil);

— loomakeste väljavõtmise meetodi üksikasjalik kirjeldus ja tõhusus;

▼M6

Katsetulemused

— noorloomade arv, mis määratakse igas katsenõus katse lõpus;

— täiskasvanute arv ja nende suremus (%) igas katsenõus katse lõpus;

— ilmnenud füsioloogiliste või patoloogiliste sümptomite või selgete käitumise muutuste kirjeldus;

— võrdluskemikaaliga saadud tulemused;

— NOEC/LOEC, suremuse LC_x ja paljunemise EC_x väärtused (tavaliselt LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} ja EC_{10}) koos 95 % usaldusvahemikuga. Andmete kirjeldamiseks kasutatud mudeli graafik, selle võrrand ja sobitamisega leitud parameetrid (vt (9));

— kogu teave ja vaatlused, mis aitaksid tõlgendada tulemusi.

— kui testiti hüpoteesi, siis tegeliku testi võimsus (9);

— kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse jooksul esinenud ebatavalised nähtused;

— katse nõuetekohasus;

— kui hinnati täheldatavat toimet mitteavaldavat kontsentratsiooni (NOEC), siis minimaalne tuvastatav erinevus.

KIRJANDUS

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve

(3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London

(4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388

(5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118

(6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)

(7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268

(8) Käesoleva lisa peatükk C.36, „Röövlesta (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) sigivuse katse mullas".

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris

(10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205

(13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼M6

1. liide

Mõisted

Käesolevas katsemeetodis on kasutatud järgmisi mõisteid (kõik mõjuga seotud kontsentratsioonid on väljendatud uuritava kemikaali massina katsepinnase kuivmassi kohta):

Kemikaal – aine või segu.

NOEC (*no observed effect concentration* – täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) – uuritava kemikaali kontsentratsioon, millel puudub täheldatav mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul ei avalda NOEC-le vastav kontsentratsioon kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) täheldatavat toimet teatava kokkupuuteaja jooksul.

LOEC (*lowest observed effect concentration* – vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon) – uuritava kemikaali madalaim kontsentratsioon, millel on kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt oluline mõju ($p < 0,05$) teatava kokkupuuteaja jooksul.

EC_x (x % toimet avaldav kontsentratsioon) – kontsentratsioon, mis põhjustab katseorganismidel kontrollrühmaga võrreldes x % toimest teatava kokkupuuteaja jooksul. Näiteks EC_{50} on hinnanguline kontsentratsioon, mis avaldab 50 % kemikaaliga kokkupuutesse viidud isendite puhul teatava kokkupuuteaja jooksul mõju, mida mõõdetakse katses määratava näitajaga.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼**M6**

2. liide

Hooghännaliste katse peamised toimingud ja ajakava

Katse etapid võib kokku võtta järgmiselt:

Aeg (päevad)	Toimingud
– 23 kuni – 26	Sünkroonse *F. fimetaria* kultuuri ettevalmistamine
– 14	Valmistatakse tehismuld (kuivade koostisosade kokkusegamine) Kontrollitakse tehismulla pH-d ja viiakse see vajaliku väärtuseni Mõõdetakse mulla maksimaalne veemahutavus
– 9 kuni – 12	Sünkroonse *F. candida* kultuuri ettevalmistamine
– 2 kuni – 7	Mulla eelnev niisutamine
– 1	Noorloomad jaotatakse partiidesse Valmistatakse põhilahused ja lisatakse uuritav kemikaal, kui on vajalik lahusti kasutamine
0	Valmistatakse põhilahused ja lisatakse uuritav kemikaal, kui see on vaja lisada tahke kemikaalina, vesilahusena või kui see on vaja kanda pinnale. Mõõdetakse mulla pH ja kaalutakse nõud. Lisatakse sööt. Mullale kantakse hooghännalised.
14	Doosipiirkonna leidmise katse *F. fimetaria* puhul: lõpetatakse katse, võetakse loomad välja, mõõdetakse mulla pH ja veekadu (mass). Põhikatsed: mõõdetakse niiskusesisaldus ja täiendatakse veega ning lisatakse 2–10 mg pärmi
21	*F. fimetaria* põhikatse: lõpetatakse katse, võetakse loomad välja, mõõdetakse mulla pH ja veekadu (mass). Doosipiirkonna leidmise katse *F. candida* puhul: lõpetatakse katse, võetakse loomad välja, mõõdetakse mulla pH ja veekadu (mass).
28	*F. candida* põhikatse: lõpetatakse katse, võetakse loomad välja, mõõdetakse mulla pH ja veekadu (mass).

▼M6

3. liide

***F. fimetaria* ja *F. candida* kasvatamise ja sünkroniseerimise juhised**

Siinses juhendis esitatud aegu ja kestust tuleks kontrollida iga konkreetse hooghännalisetüvega, kuna on vaja tagada, et ajastamine võimaldaks saada piisavalt sünkroniseeritud noorloomad. Põhimõtteliselt määrab sobiva päeva munade ja sünkroonsete noorloomade kogumiseks munemise aeg pärast täiskasvanud loomade viimist värskesse substraati ja munade koorumiseni kuluv aeg.

Soovitatav on kasutada alalist tüvikultuuri, mis koosneb näiteks 50 nõust / Petri tassist. Tüvikultuuri hoitakse heas toitumuses iganädalase söötmise, kastmise ja vana sööda ja laipade kõrvaldamisega. Kui hooghännalisi on substraadil liiga vähe, võib see pärssida nende elutegevust liigse seente kasvu tõttu. Kui tüvikultuuri kasutatakse munade tootmiseks liiga sageli, võib kultuur väsida. Väsimuse tunnused on surnud täiskasvanud ja hallitus substraadil. Kultuuri noorendamiseks võib kasutada sünkroniseeritud loomade saamisest ülejäänud mune.

Sünkroonses kultuuris saab *F. fimetaria* isasloomi eristada emasloomadest peamiselt suuruse alusel. Isasloomad on emasloomadest selgelt väiksemad ja nende kõndimise kiirus on suurem kui emasloomadel. Õige valimine soo järgi nõuab vaid natuke harjutamist ja tulemust saab kontrollida suguelundipiirkonna vaatlemisega mikroskoobi all (13).

1. **Kasvatamine**

1.a. *Kasvatamissubstraadi valmistamine*

Kasvatamissubstraat on nn Pariisi krohv (kips ehk kaltsiumsulfaat) aktiivsöega. Need moodustavad kokku niiske substraadi, milles aktiivsöe ülesanne on siduda eralduvaid gaase ja väljaheiteid (14, 15). Hooghännaliste vaatlemise hõlbustamiseks võib kasutada mitmesuguseid aktiivsöe vorme. Näiteks *F. candida* ja *F. fimetaria* puhul kasutatakse pulbrilist aktiivsütt (mille tulemusel saadakse must/hall Pariisi krohv):

Substraadi koostisained:

— 20 ml aktiivsütt,

— 200 ml destilleeritud vett,

— 200 ml kipsi

või

— 50 g pulbrilist aktiivsütt,

— 260–300 ml destilleeritud vett,

— 400 g kipsi.

Substraadisegul lastakse enne kasutamist seista.

1.b. *Paljundamine*

Hooghännalisi hoitakse sellistes nõudes nagu Petri tassid (90 mm × 13 mm), mille põhi on kaetud 0,5 cm paksuse kipsi-söe kihiga. Neid kasvatatakse 20 ± 1 °C juures ja valguse-pimeduse tsükkel on 12-12 tundi (400–800 luksi). Nõusid hoitakse alati niiskena ja tagatakse suhteline õhuniiskus nõudes 100 %. Seda saab tagada vaba vee olemasoluga poorses kipsis, kuid tuleb

▼M6

vältida veekihi tekkimist kipsi pinnal. Veekadu on võimalik vältida, kui ruumis tagatakse kõrge õhuniiskus. Kõik surnud isendid tuleks nõudest kõrvaldada, samuti hallitanud sööt. Munemise stimuleerimiseks on vaja viia täiskasvanud isendid üle Petri tassidesse, milles on kipsist ja aktiivsöest valmistatud värske substraat.

1.c. *Sööda päritolu*

Nii *F. candida* kui ka *F fimetaria* söödana kasutatakse granuleeritud kuivatatud pagaripärmi. Värsket sööta antakse üks või kaks korda nädalas, et vältida sööda hallitamist. Sööt pannakse väikse kuhjakesena otse kipsile. Lisatava pagaripärmi massi tuleb kohandada hooghännaliste populatsiooni suurusele; üldjuhul on piisav 2–15 mg.

2. **Sünkroniseerimine**

Katse tuleb teha sünkroniseeritud loomadega, et saada homogeensed katseloomad, kellel on üks ja sama arengustaadium ja suurus. Lisaks võimaldab sünkroniseerimine eristada *F. fimetaria* isas- ja emasloomi alates 3 nädala vanustest loomadest ja kasutada edaspidi soolist dimorfismi st suuruseerinevusi. Allpool esitatud toimimiskäik on ettepanek, kuidas saada sünkroniseeritud loomi (praktilised sammud ei ole kohustuslikud).

2.a. *Sünkroniseerimine*

— Valmistage ette nõud, milles on 0,5 cm paksune kiht kipsi-söe substraati.

— Munade saamiseks viige 150–200 täiskasvanud *F. fimetaria* isendit või 50–100 täiskasvanud *F. candida* isendit 15–20 parimast tüvikultuurinõust, milles on 4–8 nädala vanune substraat, ettevalmistatud nõudesse ja söödaks pange neile 15 mg pagaripärmi. Tuleks vältida noorloomade ülekandmist koos täiskasvanutega, kuna noorloomade juuresolek võib pidurdada munemist.

— Hoidke kultuuri 20 ± 1 °C juures (keskmine peaks olema 20 °C) ja valguse-pimeduse tsükli juures 12-12 tundi (400–800 luksi). Hoolitsege selle eest, et värske sööt oleks kättesaadav ja õhk oleks veeauruga küllastunud. Sööda puudumisel võivad loomad roojata munade peale, mille tulemusel hakkab munadel kasvama hallitus, või *F. candida* võib hakata sööma oma mune. 10 päeva pärast koguge munad ettevaatlikult nõela ja spaatli abil ja viige üle nn munapaberile (väiksed filterpaberitükid, mis on kastetud kipsi-aktiivsöe kõrdisse), ja pange see nõusse, milles on värske kipsi-aktiivsöe- substraat. Lisage substraadile mõned terad pärmi, et noori juurde meelitada ja sundida neid lahkuma munapaberilt. Oluline on, et munapaber ja substraat oleksid niisked, muidu munad kuivavad ära. Teise võimalusena võib täiskasvanud loomad eemaldada sünkroniseerimiskultuuri nõudest pärast seda, kui nad on munenud 2 või 3 päeva.

— Kolme päeva pärast on koorunud enamik munapaberil olevaid mune ja mõned noorloomad võivad olla juba munapaberi all.

— Ühesuguse vanusega noorloomade saamiseks kõrvaldage munapaber koorumata munadega Petri tassist pintsettidega. Noorloomad vanusega 0–3 päeva jäävad Petri tassi ja neid söödetakse pagaripärmiga. Koorumata munad visake minema.

— Hoolitsege munade ja koorunud noorloomade eest samuti kui täiskasvanud loomade eest. Eelkõige *F. fimetaria* puhul võtke järgmised meetmed: tagage piisav varustatus värske söödaga; kõrvaldage vana hallitanud sööt; ühe nädala pärast jagage noorloomad uutesse Petri tassidesse nii, et nende tihedus oleks üle 200 isendi tassi kohta.

▼**M6**

2.b. *Toimimine hooghännalistega katse alustamisel*

— 9–12 päeva vanused *F. candida* või 23-26 päeva vanused *F. fimetaria* isendid kogutakse, näiteks vaakuumiga imemise abil, ning lastakse lahti väiksesse nõusse, milles on niiske kipsi-söe substraat, ja kontrollitakse nende füüsilist seisundit binokulaarmikroskoobiga (vigastuste või kahjustustega loomad visatakse ära). Kogu selle tegevuse vältel tuleb hooghännalisi hoida niiskes atmosfääris, et vältida kuivamisstressi; näiteks tehakse kõik pinnad veega märjaks jne.

— Nõu pööratakse põhjaga ülespoole ja koputatakse sellele, et kanda hooghännalised üle pinnasele. Tuleks vältida staatilise elektri tekkimist, muidu võivad loomakesed õhku tõusta või kleepuda katsenõu seinale ja ära kuivada. Staatilise elektri neutraliseerimiseks võib kasutada ionisaatorit või märga lappi nõu all.

— Sööt tuleks jaotada üle kogu mullapinna, et see ei oleks ühe klombina.

— Nõude transportimise või katse ajal tuleks vältida nõudele koputamist või muud füüsilist häirimist, kuna selle tulemusel võib pinnas kokku vajuda ja see võib takistada hooghännaliste vahelisi toimeid.

3. **Alternatiivsed hooghännaliseliigid**

Käesoleva katsemeetodi järgi katsete tegemiseks võib valida ka muid hooghännaliseliike, nagu *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Enne muu liigi kasutamist peab olema täidetud rida eeltingimusi:

— hooghännalised peavad olema üheselt ära määratud;

— tuleb esitada muu liigi valimise põhjendus;

— tuleb tagada, et katsetamisfaas hõlmab paljunemise bioloogiat, nii et see võiks olla kemikaaliga kokkupuute üks võimalikke sihtmärke;

— nende elutsükli üksikasjad peaksid olema teada: küpseks saamise vanus, munade koorumiseks kuluv aeg ja arengujärk, milles loomad viiakse kokkupuutesse kemikaaliga;

— katses kasutatava substraadi ja söödaga tuleks tagada nende jaoks optimaalsed kasvu ja paljunemise tingimused;

— täpseks ja usaldusväärseks mürgisuse hindamiseks peaks variaablus olema piisavalt madal.

▼M6

4. liide

Loomade väljavõtmine ja loendamine

1. **Väljavõtmiseks võib kasutada kahte meetodit.**

1.a. Esimene meetod: võib kasutada MacFaydeni põhimõtete alusel töötavat kontrollitud temperatuurigradiendiga ekstraktorit (1). Väljavõtmiskasti ülaosas paikneb kütteelement, mille poolt antavat soojust reguleeritakse termistoriga, mis on pandud mullaproovi pinnale. Kogumisnõud ümbritseva jahutusvedeliku temperatuuri reguleeritakse termistoriga, mis on pandud kogumiskasti põhjale (pinnasekihi alla). Termistorid on ühendatud programmeeritava juhtimisplokiga, mis tõstab temperatuuri vastavalt programmis ettenähtud ajakavale. Loomad kogutakse jahutatud kogumiskasti (2 °C), mille põhjal on kipsi-aktiivsöe kiht. Väljavõtmist alustatakse 25 °C juures ja temperatuuri tõstetakse automaatselt iga 12 tunni jooksul 5 °C ja kokku kestab väljavõtmine 48 tundi. Pärast 12 tundi temperatuuril 40 °C on väljavõtmine lõppenud.

1.b. Teine meetod: Pärast eksperimentaalset inkubatsiooniperioodi hinnatakse hooghännaliste noorloomade arvu flotatsiooniga. Sel eesmärgil tehakse katse nõudes, mille maht on ligikaudu 250 ml. Katse lõpus lisatakse umbes 200 ml destilleeritud vett. Pinnast segatakse ettevaatlikult peene värvipintsliga, et lasta hooghännalistel tõusta vee pinnale. Veele võib lisada väikse koguse, umbes 0,5 ml musta Kentmere'i fotovärvainet, et lihtsustada loendamist, suurendades kontrasti vee ja valgete hooghännaliste vahel. See värvaine ei ole hooghännaliste jaoks mürgine.

2. **Loendamine**

Loendada võib silma järgi või valgusmikroskoobiga, kasutades ujutamisnõu pinnale pandud võret, või iga nõu pinna fotografeerimisega; fotod võib hiljem hooghännaliste loendamiseks suurendatult välja trükkida või projekteerida slaididena. Loendada võib ka digitaalsete kujutiste töötlemise meetodiga (12). Kõik meetodid peaksid olema valideeritud.

▼M6

5. liide

Mulla maksimaalse veemahutavuse määramine

On leitud, et sobiv on kasutada järgmist meetodit mulla maksimaalse veemahutavuse määramiseks. Seda on kirjeldatud standardi ISO DIS 11268-2 (Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction) (Mulla kvaliteet. Saasteainete mõju vihmaussidele (*Eisenia fetida*). 2. osa. Paljunemisvõimes avalduva mõju määramine) C lisas.

Võetakse teatav kindel kogus (nt 5 g) katses kasutatud pinnast, kasutades sobivat vahendit (tigupuuriga toru vms). Toru põhi kaetakse märja filterpaberiga ja pannakse siis vees olevale tugiraamile. Toru tuleks aeglaselt sukeldada vette, kuni veetase jõuab kõrgemale pinnaseproovi ülemisest osast. Seejärel tuleks see jätta vette ligikaudu kolmeks tunniks. Kuna mitte kogu mulla kapillaaridesse adsorbeerunud vesi ei jää sinna püsima, tuleks pinnaseproovil lasta nõrguda kaks tundi, hoides toru väga peeneks jahvatatud ja väga märjal kvartsliival, mis asub kaanega nõus (et vältida kuivamist). Seejärel tuleks proov kaaluda ja kuivatada konstantse massini 105 °C juures. Veemahutavus (VM) tuleks arvutada järgmiselt:

$$\text{VM (\% kuivmassist)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kus:

S = veega küllastunud substraat + toru mass + filterpaberi mass,

T = taara (toru mass + filterpaberi mass),

D = substraadi kuivmass.

▼**M6**

6. liide

Mulla pH määramine

Järgmine meetod mulla pH määramiseks on esitatud standardis ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH (Mulla kvaliteet – pH määramine).

Kindlat kogust mulda kuivatatakse toatemperatuuril vähemalt 12 tundi. Seejärel valmistatakse mulla suspensioon (mis sisaldab vähemalt 5 grammi mulda), lisades mullale selle mahuga võrreldes vähemalt viiekordse koguse 1 M analüütiliselt puhta kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M analüütiliselt puhta kaltsiumkloriidi ($CaCl_2$) lahust. Suspensiooni loksutatakse seejärel tugevasti viis minutit ja jäetakse seejärel settima 2–24 tunniks. Seejärel mõõdetakse vedelfaasi pH pH-meetriga, mis on kaliibritud enne iga mõõtmist sobivate puhverlahustega (nt pH 4,0 ja 7,0).

▼M6

C.40. SURUSÄÄSKLASTE (*CHIRONOMIDAE*) ELUTSÜKLI MÜRGISUSKATSE SÜSTEEMIS, MIS KOOSNEB RIKASTATUD SETTEST JA VEEST VÕI SETTEST JA RIKASTATUD VEEST

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 233 (2010). Katsejuhend on ette nähtud selleks, et hinnata kemikaaliga eluaegse kokkupuute mõju magevee kahetiivaliste liigile *Chironomus* sp.; katse hõlmab 1. põlvkonna (P-põlvkonna) kogu eluea ja 2. põlvkonna (F1-põlvkonna) elu varased järgud. Meetod täiendab olemasolevaid katsemeetodeid C.28 (1) ja C.27 (15); selles kasutatakse kas rikastatud (spaigitud) veega kokkupuudet või rikastatud settega kokkupuudet. Selles võetakse arvesse *Chironomus riparius*'e ja *Chironomus dilutus*'e (varasem nimetus *C. tentans* (2)) kohta olemasolevaid mürgisuse määramise katse-eeskirju, mis on koostatud Euroopas ja Põhja-Ameerikas (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) ning millele hiljem on tehtud laboritevahelised võrdluskatsed (1, 7, 10, 11, 12). Võib kasutada ka muid hästi dokumenteeritud surusääsklaste liike, näiteks *Chironomus yoshimatsui*'d (13, 14). Täielik kokkupuute kestus on umbes 44 päeva *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui*' puhul ning umbes 100 päeva *C. dilutus*'e puhul.

2. Käesolevas katsemeetodis on kirjeldatud nii vee kaudu kui ka sette kaudu toimuvat kokkupuudet. Sobiva kokkupuutestsenaariumi valimine oleneb katse kavandatud eesmärgist. Vee kaudu kokkupuute stsenaarium, milles rikastatakse veesammast, peaks modelleerima pihustatud pestitsiidi triivimist ja hõlmab ka esialgset maksimaalset kontsentratsiooni pinnavees. Vee rikastamine on kasulik ka muud tüüpi kokkupuute (sh kemikaalilekke) modelleerimisel, kuid ei võimalda modelleerida katseperioodist pikemat kemikaali kogunemist settesse. Sel juhul ja samuti ka siis, kui sademevee äravool on pestitsiidi jaoks peamine veekogusse sattumise tee, võib rikastatud sete olla asjakohasem. Kui huvi pakuvad muud kokkupuuteviisid, võib katseplaani kergesti kohandada. Näiteks, kui uuritava kemikaali jaotumine vee ja settekihi vahel ei paku huvi ning adsorptsioon settele tuleks minimiseerida, siis võib kaaluda kunstliku asendussette (nt kvartsliiva) kasutamist.

3. Kemikaalid, mille mõju põhjasetetes elavatele organismidele on vaja katsetada, võivad settes püsida pikka aega. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga kokku puutuda mitmel viisil. Iga kokkupuutetee suhteline tähtsus ja aeg, mis on iga kokkupuutetee puhul vajalik üldisse mürgisusse panuse andmiseks, sõltub kõnealuse kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Tugevasti adsorbeeruvate kemikaalide või settega kovalentseid sidemeid moodustavate kemikaalide puhul võib tähtis kokkupuutetee olla saastunud sööda allaneelamine. Väga lipofiilsete kemikaalide mürgisuse alahindamise vältimiseks võib kaaluda settele sööda lisamist enne uuritava kemikaali kasutamist (vt punkt 31). Seega on võimalik hõlmata kõik kokkupuuteviisid ja kõikidel eluetappidel.

4. Mõõdetavad näitajad on järgmised: väljaarenenud täiskasvanute arv (nii 1. kui ka 2. põlvkonna puhul), arengu kiirus (nii 1. kui ka 2. põlvkonna puhul), täielikult arenenud ja elusate täiskasvanute sooline jaotumine (nii 1. kui ka 2. põlvkonna puhul), munanööride arv emassääse kohta (ainult 1. põlvkond) ja munanööride viljakus (ainult 1. põlvkond).

5. Tungivalt soovitatakse kasutada spetsiaalselt koostatud setet. Spetsiaalselt koostatud settel on loodusliku sette ees mitmeid eeliseid:

▼M6

— väheneb katsete hajuvus, kuna nii saadakse reprodutseeritav standardiseeritud maatriks ja kõrvaldatakse vajadus saastumata ja puhta setteallika leidmiseks;

— katseid võib alustada ükskõik millal, ei tule arvestada katse setete hooajalist muutlikkust ja setet ei ole vaja eeltöödelda kohaliku fauna kõrvaldamiseks;

— vähenevad kulud, võrreldes korrapärase töö jaoks vajalike piisavate settekoguste hankimisega välitingimustes;

— spetsiaalselt koostatud sete võimaldab võrrelda erinevaid mürgisuse uuringuid ja järjestada kemikaale mürgisuse järgi (3).

6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

7. Kõigepealt puutuvad surusääsklaste esimese kasvujärgu vastsed kokku sette-vee süsteemis teatavas kontsentratsioonivahemikus oleva uuritava kemikaaliga. Katse alguses pannakse esimese kasvujärgu vastsed (1. põlvkond) katsenõudesse, mis sisaldavad rikastatud setet või teise võimalusena rikastatakse uuritava kemikaaliga vett pärast vastsete lisamist. Hinnatakse surusääskede väljaarenemist, selleni kuluvat aega ning täielikult arenenud ja elusate sääskede soolist jaotumist. Väljaarenenud valmikud viiakse üle paljunduspuuridesse, et võimaldada neil parve koguneda, paarituda ja muneda. Hinnatakse munetud munanööride arvu ja nende viljakust. Kõnealustest munanööridest saadakse 2. põlvkonna esimese kasvujärgu vastsed. Need vastsed pannakse värskelt ettevalmistatud katsenõudesse (rikastamine kemikaaliga nagu 1. põlvkonna puhul) et määrata 2. põlvkonna elujõulisus, mille jaoks hinnatakse nende väljaarenemist, selleni kuluvat aega ja täielikult arenenude ja elusate täiskasvanute soolist jaotumist (elutsükli katse skeem on esitatud 5. liites). Kõiki andmeid analüüsitakse kas regressioonimudeli abil, et leida kontsentratsioon, mis põhjustab asjakohase näitaja vähenemise X %, või kasutatakse hüpoteesi testimist, et määrata täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC). Selleks on vaja statistiliste testide abil võrrelda tulemusi, mis saadi uuritava kemikaaliga kokkupuutesse viimisel, tulemustega, mis saadi sobivate võrdluskemikaalidega kokkupuutesse viimisel. Tuleks märkida, et rikastatud veega kokkupuute stsenaariumis võivad kiiresti laguneva kemikaali puhul iga põlvkonna hilisemad arenguetapid (nt nukustaadium) puutuda kokku kemikaali oluliselt madalama kontsentratsiooniga vees kui 1. järgu vastsed. Kui see tekitab probleeme ja igal elutsükli etapil peaks olema enam-vähem ühesugune kokkupuude kemikaaliga, võib kaaluda katsemeetodis järgmiste muudatuste tegemist:

— paralleelkatsete puhul rikastatakse vett elutsükli eri etappidel, või

— katse mõlemas faasis (1. ja 2. põlvkond) kasutatakse katsesüsteemi korduvat rikastamist (või katva veekihi uuendamist), kusjuures rikastamise (uuendamise) aegade valimisel arvestatakse uuritava kemikaali lagunemise kiirust.

Selliseid muudatusi saab teha üksnes vee rikastamise, kuid mitte sette rikastamise puhul.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

8. Teada peaks olema uuritava kemikaali lahustuvus vees, aururõhk ja log K_{ow}, mõõdetud või arvutatud jaotumine settesse ning stabiilsus vees ja settes. Uuritava kemikaali kvantitatiivseks määramiseks katvas veekihis, poorivees ja settes peaks olema usaldusväärne analüüsimeetod; meetodi täpsus ja määramispiir peaksid olema teada. Kasulik on teada uuritava

▼M6

kemikaali struktuurivalemit ja puhtust. Samuti on kasulik teada uuritava kemikaali käitumist (näiteks hajumine, abiootiline ja biootiline lagunemine jne). Täiendavad juhised selliste kemikaalide mõju uurimiseks, mille füüsikalis-keemilised omadused raskendavad selle katse tegemist, on esitatud väljaandes (16).

VÕRDLUSKEMIKAALID

9. Võrdluskemikaale võib katsetada regulaarselt, et veenduda selles, et laboris kasvatatava populatsiooni tundlikkus ei ole muutunud. Nagu vesikirpudegi puhul, piisab sellest, kui teha 48-tunnine ägeda mürgisuse katse (17). Ent kuni ägeda mürgisuse testimise valideeritud katse-eeskiri muutub kättesaadavaks, võib kaaluda kroonilise mürgisuse katse tegemist vastavalt käesoleva lisa peatükile C.28. Laboritevahelistes võrdlustes ja valideerimisuuringutes edukalt kasutatud võrdlustoksikandid on näiteks: lindaan, trifluraliin, pentaklorofenool, kaadmiumkloriid ja kaaliumkloriid (1, 3, 6, 7, 18).

KATSE NÕUETEKOHASUS

10. Katse nõuetekohasuse tõendamisel arvestatakse järgmist:

— kontrollnõus peab katse lõpuks keskmiselt välja arenema vähemalt 70 % putukaid mõlema põlvkonna puhul (1, 7);

— *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul peaks 85 % täiskasvanud mõlema põlvkonna sääskedest välja arenema kontrollnõus 12–23 päeva jooksul pärast esimese kasvujärgu vastsete viimist nõudesse; *C. dilutus*'e puhul on vastuvõetav vahemik 20–65 päeva;

— täielikult arenenud ja elusate sääskede hulgas peaks sooline jaotumine (emas- ja isassääskede suhtarv) kontrollnõus olema vähemalt 0,4, kuid mitte üle 0,6;

— igas paljunduspuuris peaks 1. põlvkonna kontrollkatses olema vähemalt 0,6 munanööri iga sellesse puuri viidud emassääse kohta;

— viljakate munanööride osakaal kontrollrühma 1. põlvkonna igas paljunduspuuris peaks olema vähemalt 0,6;

— kokkupuuteaja lõpus tuleks mõlema põlvkonna puhul mõõta igas nõus pH ja lahustunud hapniku kontsentratsioon. Hapnikukontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest (ASV ([1])) ja katva veekihi pH peaks kõigis katsenõudes olema vahemikus 6–9;

— vee temperatuur ei tohiks erineda rohkem kui ± 1,0 °C võrra.

MEETODI KIRJELDUS

Katsenõud ja paljunduspuurid

11. Vastsed viiakse kemikaaliga kokkupuutesse 600 ml keeduklaasides läbimõõduga umbes 8,5 cm (vt 5. liide). Muud nõud on ka sobivad, kuid need peaksid tagama katva veekihi ja sette vajaliku paksuse. Sette pind peaks olema piisav, et tagada 2–3 cm^2 pinda iga vastse kohta. Settekihi paksuse ja katva veekihi paksuse suhe peaks olema ligikaudu 1:4. Paljundamispuurid (suurusega vähemalt 30 cm kõik kolm mõõdet) on pealt ja vähemalt ühelt küljelt kaetud marliga (võrgusilma suurus on ligikaudu 1 mm) (vt 5. liide). Igasse puuri pannakse munemise jaoks 2-liitrise mahutavusega kristallisaator, mis sisaldab katses kasutatavat vett ja setet. Ka kristallisaatoris peaks settekihi paksuse ja seda katva veekihi paksuse suhe

([1]) Temperatuuril 20 °C on standardse atmosfäärirõhu puhul magevee ASV 9,1 mg/l (60 % sellest on 5,46 mg/l).

▼M6

olema ligikaudu 1:4. Pärast munanööride kristallisaatorist eemaldamist pannakse need 12 süvendiga mikrotiiterplaadile (üks nöör igasse mikrotiiterplaadi süvendisse, mis sisaldab vähemalt 2,5 ml kristallisaatorist võetud rikastatud vett), seejärel plaat kaetakse kaanega, et vältida olulist aurumist. Munanööride hoidmiseks võib kasutada ka muid sobivaid nõusid. Peale mikrotiiterplaatide peaksid kõik katsenõud ja muud katsesüsteemiga kokku puutuvad seadmed olema valmistatud täies ulatuses klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist (näiteks polütetrafluoroetüleenist).

Liigi valimine

12. Katses kasutatav liik on eelistatavalt *Chironomus riparius*. Võib kasutada ka *C. yoshimatsui*'d. Sobib ka *C. dilutus*, aga selle käsitlemine on keerukam ja see nõuab pikemat katseperioodi. 2. liites on esitatud andmed *C. riparius*'e kasvatamise meetodite kohta. Teave kasvatamistingimuste kohta on kättesaadav ka kirjandusest: *C. dilutus* (5) ja *C. yoshimatsui* (14). Enne katset tuleks kinnitada liigi määramist, aga seda ei nõuta enne iga katset, kui organismid pärinevad asutusesisesest kultuurist.

Sete

13. Eelistatavalt tuleks kasutada spetsiaalselt koostatud setet (mida nimetatakse ka taastatud, tehislikuks või sünteetiliseks setteks). Loodusliku sette kasutamise korral tuleks seda iseloomustada (vähemalt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, samuti on soovitatav määrata muud parameetrid, nagu süsiniku-lämmastiku suhe ja osakeste suurus) ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid ega muid organisme, kes võiksid surusääsklaste vastsetega konkureerida või neid süüa. Samuti soovitatakse lasta settel enne katse tegemist seitse päeva katsetingimustes tasakaalustuda. Soovitatakse kasutada järgmist spetsiaalselt koostatud setet (1, 20, 21):

a. 4–5 % (kuivmass) turvast: pH väärtus võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; tähtis on kasutada peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) pulbrilist turvast, mida on kuivatatud ainult õhu käes;

b. 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (kaoliniidisisaldus eelistatavalt üle 30 %);

c. 75–76 % (kuivmass) kvartsliiva (see peaks peamiselt koosnema peenest liivast ja rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm);

d. lisatakse deioniseeritud vett, et lõplikus segus oleks niiskusesisaldus 30–50 %;

e. sette lõpliku segu reguleerimiseks pH vahemikku 7,0 ± 0,5 lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$);

f. lõpliku segu orgaanilise süsiniku sisaldus peaks olema 2 % (± 0,5 %) ja see tuleks õigeks seada sobivas koguses turba ja liiva kasutamisega kooskõlas alapunktidega a ja c.

14. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada. Sette koostisosi tuleks kontrollida, et tõendada keemilise saaste puudumine (näiteks raskmetallid, kloororgaanilised ühendid, fosfororgaanilised ühendid). Spetsiaalselt koostatud sette valmistamise näidis on esitatud 3. liites. Kuivade

▼M6

koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast katva veekihi lisamist ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste hõljumist) ja et turvas või sete on piisavalt konditsioneerunud.

Vesi

15. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 2. ja 4. liites esitatud lahjendamiseks kasutatava vee nõutavatele keemilistele omadustele. Kasvuveena ja katseveena lubatakse kasutada iga sobivat vett, looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett (vt 2. liide) või deklooritud kraanivett, kui surusääsklased jäävad selles kasvatamise ja katsetamise ajal ellu ega ilmuta stressi tunnuseid. Katse alguses peaks katsevee pH olema vahemikus 6–9 ja vee summaarne karedus ei tohiks olla suurem kui 400 mg/l $CaCO_3$-na. Kui oletatakse karedust tekitavate ioonide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada siiski väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks sel juhul kasutada Elendti kasvukeskkonda M4). Kogu uuringu vältel tuleks kasutada sama tüüpi vett. 4. liites loetletud vee kvaliteedi omadusi tuleks mõõta vähemalt kaks korda aastas või siis, kui kahtlustatakse, et kõnealused omadused võivad olla oluliselt muutunud.

Põhilahused. Rikastatud vesi

16. a. Uuritava aine kontsentratsioonid arvutatakse veesambas olevate kontsentratsioonide alusel, s.o setet katva veekihi alusel. Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks on soovitatav lahustada uuritav kemikaal katsevees. Mõnel juhul võib sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks olla vajalik lahusti või dispergendi kasutamine. Sobivad lahustid on atsetoon, etüleenglükoolmonoetüüleeter, etüleenglükooldimetüüleeter, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergendid on Cremophor RH40, Tween 80, metüültselluloos (0,01 %) ja HCO-40. Solubiliseeriva aine kontsentratsioon lõplikus katse kasvukeskkonnas peaks olema minimaalne (s.o $\leq$ 0,1 ml/l) ja see peaks olema sama kõigi kokkupuutekontsentratsioonide puhul. Kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, ei tohiks see oluliselt mõjutada suremust, mida kontrollitakse lahusti kontrollkatse võrdlemisel negatiivse (vee) kontrollkatsega. Siiski tuleks teha kõik, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

Põhilahused. Rikastatud sete

16. b. Tavaliselt valmistatakse valitud kontsentratsiooniga rikastatud setted uuritava kemikaali lahuse otse settesse lisamise teel. Deioniseeritud vees lahustatud uuritava kemikaali põhilahus segatakse spetsiaalselt koostatud settega valtsmasina või söödasegaja abil või käsitsi. Vees halvasti lahustuva uuritava kemikaali võib lahustada võimalikult väikses sobiva orgaanilise lahusti (näiteks heksaan, atsetoon või kloroform) koguses. See lahus segatakse seejärel 10 g peene kvartsliivaga iga katsenõu jaoks. Lahustil lastakse auruda ja see tuleks liivast täielikult kõrvaldada; seejärel segatakse liiv sobiva koguse settega. Uuritava aine solubiliseerimiseks, dispergeerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada ainult kergesti lenduvaid kemikaale. Tuleks meeles pidada, et sette valmistamisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali ja liiva segust pärit liiva (s.o sete tuleks siis valmistada väiksema liivakogusega). Tuleks hoolitseda, et settele lisatud

▼M6

uuritav kemikaal oleks settes põhjalikult ja ühtlaselt jaotatud. Vajaduse korral võib homogeensuse taseme määramiseks analüüsida alamproove.

KATSE KAVANDAMINE

17. Katse kavandamine hõlmab katse kontsentratsioonide arvu ja vahemike valimist, iga kontsentratsioonitaseme jaoks nõude arvu ning igas nõus olevate vastsete arvu valimist, samuti kristallisaatorite ja paljunduspuuride arvu valimist. Allpool on kirjeldatud katsete kavandamine EC_x ja NOEC määramiseks, samuti piirsisalduskatse kavandamine.

Katse kavandamine regressioonanalüüsi tegemiseks

18. Toimet avaldav kontsentratsioon (EC_x) ja kontsentratsioonivahemik, mis pakub huvi uuritava kemikaali mõju uurimisel, tuleks hõlmata katses kasutatavate kontsentratsioonidega, nii et otsitavat näitajat ei tuleks leida ekstrapoleerimisega väljapoole mõõdetud andmete vahemikku. Tuleks vältida suurt ekstrapoleerimist allapoole madalaimat kontsentratsiooni või ülespoole kõrgeimat kontsentratsiooni. Eelnev annusevahemiku leidmise katse katsemeetodi C.27 või C.28. järgi võib aidata valida sobivat uuritavate kontsentratsioonide vahemikku.

19. EC_x lähenemisviisi korral tuleks teha katsed vähemalt viie kontsentratsiooniga ja kaheksa paralleelkatsega igal kontsentratsioonil. Iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada kahte paljunduspuuri (A ja B). Kaheksa paralleelkatset jagatakse kahte rühma, kummaski neli paralleelkatset, millest valmikud kogutakse kumbagi paljunduspuuri. Selline paralleelkatsete koondamine on vajalik selleks, et saada paljunduspuuri piisav arv valmikuid paljunemise usaldusväärseks hindamiseks. Siiski tehakse ka 2. põlvkonnaga kaheksa paralleelkatset, mida alustatakse kemikaaliga kokkupuutunud populatsioonidest paljunduspuurides. Kontsentratsioonidevaheline kordaja ei tohiks olla suurem kui 2 (erandi võib teha juhul, kui doosi mõju graafiku tõus on madal). Kui suurendatakse eri mõjuga uuritavate kontsentratsioonide arvu, võib iga doosi paralleelkatsete arvu vähendada kuuele (kolm kumbagi paljunduspuuri),. Paralleelkatsete arvu suurendamine või uuritavate kontsentratsioonide vahemiku vähendamine enamasti vähendab usaldusvahemikku EC_X ümber.

Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) hindamise kavandamine

20. NOEC lähenemisviisi puhul tuleks kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni vähemalt kaheksa paralleelkatsega (neli kumbagi paljunduspuuri A ja B) ja nende kontsentratsioonide erinevuse kordaja ei tohiks olla suurem kui kaks. Paralleelkatsete arv peaks olema piisav, et tagada piisav statistiline võimsus, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega (α = 0,05). Arengu kiiruse, viljakuse ja sigivuse puhul on tavaliselt kohane kasutada dispersioonanalüüsi (ANOVA), millele järgneb Dunnetti või Williamsi test (22–25). Väljaarenemise suhte ja soolise jaotumise suhtarvu puhul võib kasutada Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpset testi (Bonferroni parandusega) või Mantel-Haentzali testi.

Piirsisalduskatse

21. Kui esialgsetes annusevahemiku leidmise katsetes kuni maksimaalse kontsentratsioonini mõju ei leitud, võib teha piirsisalduskatse (üks uuritava aine kontsentratsioon ja kontrollkatse(d)). Piirsisalduskatse eesmärk on näidata, et uuritava kemikaali mürgine toime avaldub kontsentratsioonil,

▼M6

mis on katses kasutatud piirkontsentratsioonist kõrgem. Vee puhul soovitatakse kontsentratsiooni 100 mg/l ja sette puhul 1 000 mg/kg (kuivmass). Enamasti tuleb nii kemikaaliga kokkupuutuvate rühmadega kui ka kontrollrühmadega teha vähemalt kaheksa paralleelkatset. Tuleks tõendada piisava statistilise võimsuse olemasolu, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega (α = 0,05). Mõõdetavate suuruste (nt arengu kiirus) puhul, kui andmed vastavad käesoleva katse nõuetele (normaalsus, ühtlane hajumine), on statistilise meetodina asjakohane kasutada t-testi. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mittevõrdse hajumise t-testi või mitteparameetrilist testi, näiteks Wilcoxoni-Manni-Whitney testi. Valmikute väljaarenemise suhte puhul on asjakohane kasutada Fisheri täpset testi.

MÄÄRAMISE KÄIK

Kokkupuutetingimused

Vee-sette süsteemi valmistamine (kui rikastatakse vesi)

22. a. Spetsiaalselt koostatud sete (vt punktid 13–14 ja 3. liide) lisatakse igasse katsenõusse ja kristallisaatorisse, et see moodustaks kihi paksusega vähemalt 1,5 cm (kristallisaatoris võib olla natuke õhem), kuid mitte üle 3 cm. Lisatakse vesi (vt punkt 15), nii et settekihi paksuse ja veekihi sügavuse suhe ei oleks suurem kui 1:4. Pärast katsenõu ettevalmistamist tuleks sette-vee süsteem jätta kerge aeratsiooniga seisma ligikaudu seitsmeks päevaks enne 1. või 2. põlvkonna esimese kasvujärgu vastsete lisamist (vt punkt 14 ja 3. liide). Kristallisaatori sette-vee süsteemi ei aereerita katse ajal, kuna nendes ei ole vaja tagada vastsete ellujäämist (munanöörid kogutakse juba enne koorumist). Sette koostisosade eraldumise ja veesambas katsevee lisamise ajal peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta plastikkettaga ja valada vett kettale. Ketas eemaldatakse kohe pärast valamist. Võib kasutada ka muid võtteid.

Vee-sette süsteemi valmistamine (kui rikastatakse sete)

22. b. Rikastatud setted valmistatakse vastavalt punktile 16b, pannakse nõudesse ja kristallisaatoritesse ning neile lisatakse kattev veekiht, et saada sette-vee ruumala suhe 1:4. Settekihi paksus peaks olema 1,5–3 cm (kristallisaatoris võib see olla mõnevõrra õhem). Sette osade eraldumise ja veesambas katsevee lisamisel peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta vee valamise ajaks plastikkettaga, mis pärast vee valamist kohe eemaldatakse. Võib kasutada ka muid võtteid. Kui rikastatud sete koos katva veekihiga on valmistatud, on soovitatav lasta uuritaval kemikaalil jaotuda settefaasist vee faasi (4, 5, 7, 18). Seda tuleks eelistatavalt teha katses kasutatavates temperatuuri- ja õhustustingimustes. Vajalik tasakaalustumisaeg sõltub settest ja kemikaalist ning võib kesta tunde, päevi ja harvadel juhtudel kuni viis nädalat. Kuna paljud kemikaalid võivad sellise aja jooksul laguneda, ei oodata tasakaaluoleku teket, vaid soovitatakse 48-tunnist tasakaalustamise ajavahemikku. Kui aga kemikaali lagunemise poolestusaeg settes on pikk (vt punkt 8), võib tasakaalustumisaega pikendada. Kõnealuse täiendava tasakaalustamise ajavahemiku lõpus tuleks mõõta uuritava kemikaali kontsentratsioon katvas veekihis, poorivees ja settes vähemalt suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil (vt punkt 38). Need uuritava kemikaali analüütilised määramised võimaldavad arvutada massitasakaalu ja väljendada tulemusi mõõdetud kontsentratsioonide alusel.

23. Katsenõud peaksid olema kaetud (näiteks klaasplaadiga). Vajaduse korral lisatakse vee aurumise kompenseerimiseks ja uuringu algse veetaseme saavutamiseks vett. Soolade kogunemise vältimiseks tuleks lisada destilleeritud või deioniseeritud vett. Kristallisaatoreid paljunduspuurides ei

▼M6

kaeta ja nende puhul võib (aga ei tarvitse) olla vajalik veekao kompenseerimine katse ajal, sest munanöörid puutuvad veega kokku ainult ligikaudu ühe päeva ja kristallisaatoreid kasutatakse ainult ühe lühikese katseetapi jooksul.

Katseorganismide lisamine

24. Neli kuni viis päeva enne 1. põlvkonna katseorganismide esimese kasvujärgu vastsete lisamist katsenõudesse tuleks võtta kultuurist munamassid ja panna need väikestesse nõudesse, milles on kultuuri kasvukeskkond. Võib kasutada põhikultuuri vana kasvukeskkonda või värskelt valmistatud kasvukeskkonda. Igal juhul tuleks lisada kultuuri kasvukeskkonnale väikses koguses sööta, näiteks paar tilka peeneks jahvatatud helbelise kalasööda suspensiooni filtraadist (vt 2. liide). Tuleks kasutada ainult värskelt munetud munamasse. Tavaliselt hakkavad vastsed kooruma paari päeva möödumisel munade munemisest (2–3 päeva *C. riparius*'e puhul temperatuuril 20 °C ning 1–4 päeva *C. dilutus*'e puhul temperatuuril 23 °C ja *C. yoshimatui* puhul temperatuuril 25 °C) ning vastsete kasv toimub neljas kasvujärgus, millest iga kasvujärk kestab 4–8 päeva. Katses tuleks kasutada esimese kasvujärgu vastseid (kuni 48 tundi pärast koorumist). Vastsete kasvujärku on võimalik kontrollida peakapsli laiuse mõõtmisega (7).

25. Tõmbi pipeti abil jaotatakse 20 1. põlvkonna esimese kasvujärgu vastset juhuslikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad sette ja vee süsteemi. Vee aereerimine peatatakse vastsete katsenõudesse lisamise ajaks ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist (vt punkt 32). Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatavate vastsete arv iga kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni (EC_X) hindamise korral vähemalt 120 (6 paralleelkatset igal kontsentratsioonil) ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramise korral 160 (8 paralleelkatset igal kontsentratsioonil). Kui rikastatud on sete, algab kokkupuude vastsete lisamisega.

Katva veekihi rikastamine

26. Kakskümmend neli tundi pärast 1. põlvkonna esimese kasvujärgu vastsete lisamist lisatakse uuritav kemikaal katva veekihi sambasse ja alustatakse uuesti kerget aereerimist (uuringu kava võimalike muudatuste kohta vt punkt 7). Uuritava kemikaali põhilahuseid lisatakse pipeti abil väikses koguses veepinna alla. Seejärel tuleks kattev veekiht ilma setet häirimata ettevaatlikult segada. Rikastatud vee stsenaariumi korral algab kokkupuude veesamba rikastamisega (st üks päev pärast vastsete lisamist).

Väljaarenenud valmikute kogumine

27. Sääskede 1. põlvkonna väljaarenenud valmikud kogutakse katsenõust vähemalt üks kord, soovitavalt aga kaks korda päevas (vt punkt 36), kasutades aspiraatorit, imurit või samalaadset seadet (vaata 5. liide). Tuleb olla eriti hoolikas, et valmikuid mitte kahjustada. Ühe kemikaalikontsentratsiooni neljast katseanumast kogutud sääsed lastakse nende jaoks eelnevalt ettenähtud paljunduspuuri. Sel päeval, kui areneb välja esimene (isas-)sääsk, rikastatakse kristallisaatorid kemikaaliga, milleks lisatakse pipetiga väike kogus uuritava kemikaali põhilahust (rikastatud veega tehtav katse). Seejärel tuleks kattev veekiht ilma setet häirimata ettevaatlikult segada. Uuritava kemikaali kontsentratsioon kristallisaatoris on nominaalselt sama kui vastava kontsentratsiooniga katsenõus, millest sääsed viiakse üle asjaomasesse paljunduspuuri. Rikastatud settega katses valmistatakse kristallisaatorid ette ligikaudu 11. päeval pärast kokkupuute

▼M6

algust (s.o pärast 1. põlvkonna vastsete lisamist), et kristallisaatorid saaksid tasakaalustuda ligikaudu 48 tundi enne esimeste munanööride munemist

28. Munanöörid kogutakse paljunduspuuride kristallisaatoritest pintseti või tömbi pipeti abil. Iga munanöör pannakse nõusse, milles on samast kristallisaatorist võetud kasvukeskkond (nt 12 süvendiga mikrotiiterplaadi süvendisse, mis sisaldab vähemalt 2,5 ml kasvukeskkonda). Nõud munanööridega kaetakse kaanega, et vältida olulist aurumist.

Munanööre jälgitakse vähemalt kuus päeva pärast munemist, nii et saaks ära määrata, kas need on viljakad või viljatud. 2. põlvkonna alustamiseks võetakse vähemalt kolm, aga eelistatavalt kuus viljakat munanööri, mis valitakse igast paljunduspuurist, lisatakse veidi sööta ja lastakse kooruda. Need munanöörid peaksid olema munetud munemise tipp-ajal, mis tavaliselt on kontrollkatsetes ligikaudu 19. päev. Ideaaljuhul tuleks kõiki 2. põlvkonna katseid eri kontsentratsioonidel alustada samal päeval, kuid kuna kemikaalid mõjutavad vastsete arengut, ei pruugi see alati olla võimalik. Sellisel juhul võib suurema kontsentratsiooniga katseid alustada hiljem kui väiksema kontsentratsiooniga ja (lahusti) kontrolli katseid.

29. a. Rikastatud veega tehtava katse puhul valmistatakse sette-vee süsteem 2. põlvkonna jaoks ette, lisades uuritava kemikaali katvasse veekihti, 1 tund enne esimese kasvujärgu vastsete katsenõudesse lisamist. Uuritava kemikaali lahuseid lisatakse pipeti abil väikses koguses veepinna alla. Seejärel tuleks kattev veekiht ilma setet häirimata ettevaatlikult segada. Pärast rikastamist alustatakse kerget aereerimist.

29. b. Rikastatud settega tehtava katse puhul valmistatakse sette-vee süsteemiga katsenõud 2. põlvkonna jaoks ette samal viisil kui 1. põlvkonna jaoks.

30. Tömbi pipeti abil jaotatakse 20 2. põlvkonna esimese kasvujärgu vastset (kuni 48 tundi pärast koorumist) juhuslikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad rikastatud sette ja vee süsteemi. Vee aereerimine tuleks esimese kasvujärgu vastsete katsenõudesse lisamise ajaks peatada ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist. Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatavate vastsete arv iga kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni (EC_X) hindamise korral vähemalt 120 (6 paralleelkatset igal kontsentratsioonil) ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) määramise korral 160 (8 paralleelkatset igal kontsentratsioonil).

Sööt

31. Vastseid tuleb katsenõudes sööta eelistatavalt iga päev või vähemalt kolm korda nädalas. Noorte vastsete esimese kümne arenemispäeva jooksul on sobiv söödakogus vastse kohta päevas 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatsui* puhul) kalasööta (näiteks Tetra-Min või Tetra-Phyll, mis on kas suspendeeritud vees või jahvatatud peeneks; üksikasjad vt 2. liide). Vanemad vastsed võivad vajada mõnevõrra rohkem sööta: 0,5–1 mg vastse kohta päevas peaks olema piisav ülejäänud katse jooksul. Söödakogust tuleks vähendada kõigi kokkupuute- ja kontrollkatsete puhul, kui täheldatakse seente kasvu või kui kontrollkatses täheldatakse suremust. Kui seente kasvu ei ole võimalik peatada, tuleks katset korrata.

Allaneelamise kaudu toimuv kokkupuude kemikaaliga on toksikoloogilises mõttes üldiselt asjakohasem selliste kemikaalide puhul, millel on suur afiinsus orgaaniliste süsinikuühendite suhtes või mis seovad end

▼M6

kovalentselt settega. Kui uuritakse niisuguste omadustega kemikaali, võib vastsete elus püsimiseks ja normaalseks kasvuks vajaliku koguse sööta lisada spetsiaalselt koostatud settele juba enne stabiliseerumisperioodi, olenevalt regulatiivsetest vajadustest. Vee kvaliteedi halvenemise vältimiseks tuleks kalasööda asemel kasutada taimset materjali; näiteks võib kasutada 0,5 % (kuivmass) kõrvenõgese (*Urtica dioica*), mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) peeneks jahvatatud lehti või muud taimset materjali (*Cerophyl* või α-tselluloos). Orgaanilise sööda kogu vajaliku koguse lisamine settele enne rikastamist ei ole lihtne ülesanne vee kvaliteedi ja bioloogilise tulemuslikkuse seisukohast (21) ega ka standardmeetod, kuid hiljutised uuringud näitavad, et see meetod toimib (19, 26). Sääsevalmikud paljunemispuuris tavaliselt ei vaja söötmist, kuid viljakus ja sigivus on tavaliselt paremad, kui täiskasvanud sääskedele pakkuda söödaallikana küllastunud sahharoosilahusega immutatud puuvillavati tükki (34).

Inkubeerimistingimused

32. 24 tundi pärast mõlema põlvkonna esimese kasvujärgu vastsete lisamist hakatakse katsenõudes katvat veekihti kergelt aereerima, mida jätkatakse kogu katse vältel (tuleb olla hoolikas, et lahustunud hapniku kontsentratsioon ei langeks alla 60 % hapniku küllastuskontsentratsioonist). Aereerimiseks kasutatakse klaasist Pasteuri pipetti, mis on kinnitatud nii, et selle otsik on settekihist 2–3 cm kõrgusel, ja millest eraldub mõni mull sekundis. Lenduva kemikaali uurimisel võib kaaluda sette-vee süsteemi aereerimisest loobumist, kuid katse nõuetekohasuse kriteerium, et hapnikusisaldus vees oleks vähemalt 60 % küllastuskontsentratsioonist (punkt 10) peaks olema täidetud. Täpsemad juhendid on esitatud dokumendis (16).

33. Katse *C. riparius*'ega tehakse püsival temperatuuril 20 °C (± 2 °C). *C. dilutus*'e ja *C. yoshimatsui* puhul on soovitatavad temperatuurid vastavalt 23 °C ja 25 °C (± 2 °C). Kasutatakse 16-tunnist valgustusperioodi ja valguse intensiivsus peaks olema 500 kuni 1 000 luksi. Paljunduspuurides võib lisada veel ühetunnise hämariku ja koidu faasi.

Kokkupuute kestus

34. Rikastatud veega katse: 1. põlvkonna kokkupuuteperiood algab siis, kui uuritav kemikaal lisatakse katseanumas katvasse veekihti (üks päev pärast vastsete lisamist; kokkupuute võimalike muudatuste kohta vt punkt 7). 2. põlvkonna vastsete kokkupuude algab kohe, sest nemad pannakse sette-vee süsteemi, mis on juba rikastatud. 1. põlvkonna maksimaalne kokkupuute kestus on 27 päeva ja 2. põlvkonna oma 28 päeva (1. põlvkonna vastsed veedavad ühe päeva katsenõudes ilma kemikaaliga kokku puutumata) *C. riparius*'e ja *C. yoshimatui*' puhul. Võttes arvesse kõnealust kattumist, on kogu katse kestus on ligikaudu 44 päeva. *C. dilutus*'e puhul on kokkupuute kestused 1. ja 2. põlvkonna puhul vastavalt kuni 64 päeva ja 65 päeva. Katse kogupikkus on ligikaudu 100 päeva.

Rikastatud settega katse: kokkupuude algab vastsete lisamisega ja kestab mõlema põlvkonna puhul kuni 28 päeva *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul ning 65 päeva *C. dilutus*'e puhul.

Vaatlused

Väljaarenemine

35. Kummagi põlvkonna puhul määratakse arengu kogukestus ja täielikult väljaarenenud isas- ja emassääskede koguarv. Isased on tänu sulgjatele tundlatele ja kõhnema keha hoiakule kergesti äratuntavad.

▼M6

36. Kummagi põlvkonna katsenõusid tuleks vaadelda vähemalt kolm korda nädalas, et hinnata visuaalselt iga vastsete ebatavalist käitumist (näiteks settest väljumine, ebatavaline ujumine) kontrollnõuga võrreldes. Väljaarenemise ajal, mis algab ligikaudu 12 päeva pärast vastsete sisestamist *C. riparius*'e ja *C. yoshimatui* puhul (pärast 20 päeva *C. dilutus*'e puhul), loetakse väljaarenenud sääsed üle ja määratakse nende sugu vähemalt üks, kuid eelistatavalt kaks korda päevas (hommikul ja hilisel pärastlõunal). Pärast soo määramist eemaldatakse 1. põlvkonna sääsed ettevaatlikult katsenõust ja viiakse üle paljunduspuuri. 2. põlvkonna sääsed kõrvaldatakse ja surmatakse pärast soo määramist. Kõik munanöörid, mis on munetud 1. põlvkonna katsenõudesse, tuleks ükshaaval koguda ja viia koos vähemalt 2,5 ml veega samast nõust 12 süvendiga mikrotiiterplaatidele (või muusse sobivasse nõusse), mis kaetakse olulise aurumise vältimiseks kaanega. Samuti registreeritakse kõigi surnud vastsete ja selliste nähtavate nukkude arv, millest sääske välja ei arenenud. Paljunduspuuri, katsenõu ja imuri näidised on esitatud 5. liites.

Paljunemine

37. Mõju paljunemisele hinnatakse 1. põlvkonna sääskede munetud munanööride arvu ja nende munanööride fertiilsuse järgi. Üks kord päevas kogutakse munanöörid kristallisaatorist, mis on pandud igasse paljunduspuuri. Munanöörid tuleks koguda ja viia koos vähemalt 2,5 ml veega samast nõust 12 süvendiga mikrotiiterplaatidele (üks munanöör igasse süvendisse) või muusse sobivasse nõusse, mis kaetakse olulise aurumise vältimiseks kaanega. Iga munanööri kohta registreeritakse järgmised omadused: munemise päev, suurus (normaalne, st 1,0 ± 0,3 cm või väike; tavaliselt ≤ 0,5 cm) ja struktuur (normaalne on banaanikujuline spiraalne munanöör või ebanormaalne, nt mittespiraalne munanöör) ja fertiilsus (fertiilne või mitte). Kuue päeva jooksul pärast munanööri munemist hinnatakse selle fertiilsus. Munanöör on fertiilne, kui vähemalt üks kolmandik munadest koorub. Paljunduspuuri viidud emassääskede üldarvu põhjal arvutatakse munanööride arv emassääse kohta ja fertiilsete munanööride arv emassääse kohta. Vajaduse korral saab munade arvu munanööris hinnata seda lõhkumata, kasutades rõngaste lugemise meetodit (üksikasjad vt 32 ja 33).

Analüütilised mõõtmised

Uuritava kemikaali kontsentratsioon

38. Kokkupuute alguses (vee rikastamise korral eelistatavalt tund aega pärast uuritava kemikaali lisamist) ja lõpus tuleks analüüsida suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil vähemalt katva veekihi, poorivee ja sette proove. See kehtib mõlema põlvkonna nõude kohta. Paljunduspuuris olevas kristallisaatoris analüüsitakse ainult katvat veekihti, kuna munanöörid puutuvad kokku just sellega (rikastatud settega katses võib kaaluda settes oleva kontsentratsiooni määramist). Kui peetakse vajalikuks, võib katse ajal teha veel täiendavaid sette, poorivee või katva veekihi analüüse. Kõnealused uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramised annavad teavet uuritava kemikaali käitumise/jaotumise kohta vee-sette süsteemis. Sette ja poorivee proovide võtmiseks katse alguses ja ajal (vt punkt 39) on vaja täiendavaid katsenõusid, millest tehakse analüüse. Sette mõõtmised rikastatud veega katse puhul ei tarvitse olla vajalikud, kui uuritava kemikaali jaotumine vee ja sette vahel on vee-sette uuringus võrreldavates

▼M6

tingimustes (näiteks sette ja vee suhtarv, lisamise tüüp, sette orgaanilise süsiniku sisaldus) selgelt ära määratud või kui katvas veekihis mõõdetud kontsentratsioonid on vahemikus 80–120 % nimiväärtusest või alguses mõõdetud kontsentratsioonist.

39. Kui tehakse vahepealseid mõõtmisi (näiteks 7. ja/või 14. päeval) või kui analüüsi jaoks on vaja suurt proovi, mida ei saa katsenõust ilma katsesüsteemi mõjutamata võtta, tuleks analüüs teha samal viisil töödeldud, kuid bioloogilisteks vaatlusteks mitte kasutatavast täiendavast katsenõust (kus on ka katseorganismid) võetud proovist.

40. Tsentrifuugimine näiteks 10 000 g ja 4 °C juures 30 minuti vältel on soovitatav meetod poorivee eraldamiseks. Kui on tõendatud, et uuritav kemikaal ei adsorbeeru filtritele, võib sobida ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi olla võimalik poorivee kontsentratsiooni määramine, kuna saadav proov on liiga väike.

Füüsikalis-keemilised parameetrid

41. Katsevee pH-d ja lahustunud hapniku sisaldust katsenõudes ja kristallisaatorites ning vee temperatuuri tuleks mõõta asjakohasel viisil (vt punkt 10). Katse alguses ja lõpus tuleks kontrollnõudes ning ühes kõrgeima kontsentratsiooniga katsenõus ja kristallisaatoris mõõta karedust ja ammoniaaki.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

42. Käesoleva katse eesmärk on määrata uuritava kemikaali poolt kogu elutsükli jooksul avaldatav mõju paljunemisele ning kahe põlvkonna puhul ka arengukiirusele ning elusate ja täielikult väljaarenenud isas- ja emassääskede üldarvule. Isas- ja emassääskede väljaarenemise suhtarvu leidmiseks tuleks andmed koondada. Kui sugupoolte arengukiiruse tundlikkuses kemikaali mõju suhtes ei ole statistiliselt olulisi erinevusi, võib isaste ja emastega saadud tulemused statistilisel analüüsil koondada.

43. Toimet avaldavad kontsentratsioonid, mis põhinevad kontsentratsioonidel katvas veekihis (rikastatud vesi) või settes (rikastatud sete), arvutatakse tavaliselt katse alguses mõõdetud kontsentratsioonide alusel (vt punkt 38). Seepärast rikastatud vee puhul kontsentratsioonid, mis tavaliselt on mõõdetud mõlema põlvkonna katsenõude katvas veekihis kemikaaliga kokkupuute alguses ja kristallisaatoris, keskmistatakse iga kontsentratsioonitaseme puhul. Rikastatud sette puhul keskmistatakse kontsentratsioonid, mis tavaliselt on mõõdetud mõlema põlvkonna katsenõudes kemikaaliga kokkupuute alguses (ja soovi korral ka kristallisaatoris), iga kontsentratsioonitaseme puhul.

44. Selleks et arvutada punkti hinnang, näiteks EC_x, võib iga katsenõu ja paljunduspuuri statistilisi näitajaid kasutada tegelike paralleelkatsetena. Iga EC_x usaldusvahemiku arvutamisel tuleks arvesse võtta eri nõude tulemuste hajumist või tuleks näidata, et kõnealune hajumine on nii väike, et seda võib eirata. Kui andmeid töödeldakse mudeli parameetrite leidmiseks vähimruutude meetodiga, tuleks nõu kohta arvutatud statistilisi andmeid teisendada, et dispersioon oleks ühtlasem. EC_x-väärtused tuleks siiski arvutada pärast tulemuse esialgsele väärtusele tagasiteisendamist (31).

▼M6

45. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha hüpoteesi katsetamise abil kindlaks täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC), tuleb võtta arvesse nõudevahelist hajuvust; selline arvessevõtmine on tagatud ANOVA meetodite kasutamisel (näiteks Williamsi ja Dunnetti testid). Williamsi test on sobiv, kui doosi-toime sõltuvus peaks teooria põhjal olema monotoonne, ja Dunnetti testi tuleks kasutada siis, kui monotoonsuse hüpotees ei pea paika. Teisest küljest, olukorras, kus tavapärased dispersioonanalüüsi (ANOVA) eeldused ei ole täidetud (31), võivad paremini sobida töökindlamad testid (27).

Väljaarenemise määr

46. Väljaarenemise (väljalennu) määra kirjeldavad binaarsed andmed ja neid on võimalik analüüsida astmeliselt kohaldatava Cochrani-Armitage'i testi abil, kus eeldatakse, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, ja need andmed on selle eeldusega kooskõlas. Vastasel juhul võib kasutada Fisheri täpset testi või Manteli-Haenstzali testi Bonferroni-Holmi kohandatud p-väärtustega. Kui on tõendeid, et ühe kontsentratsiooniga paralleelkatsete hajuvus on suurem kui eeldatakse binoomjaotuse dispersiooni puhul (nn ekstra-binoomjaotuse dispersioon), tuleks kasutada töökindlat Cochrani-Armitage'i või Fisheri täpset testi, nagu on soovitatud (27).

Määratakse elus väljaarenenud sääskede (isas- pluss emasloomad) arv nõu kohta n_e, mis jagatakse sissepandud vastsete arvuga n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kus

ER = väljaarenemise (väljalennu) määr (*emergence ratio*);

n_e = väljaarenenud sääskede arv nõu kohta

n_a = sissepandud vastsete arv nõu kohta (tavaliselt 20)

Kui n_e on suurem kui n_a (see tähendab, et katsenõusse pandi kogemata rohkem vastseid, kui oli kavas), võetakse n_a võrdseks n_e-ga.

47. Ekstra-binoomjaotuse dispersiooni korral on suurte valimite puhul kõige asjakohasem alternatiivne lähenemisviis käsitleda väljaarenemise määra pideva vastusena ning kasutada selliseid meetodeid, mis on kooskõlas kõnealuste väljaarenemise määra andmetega. Suur valim on siinkohal määratletud kui väljaarenenud sääskede arv ja väljaarenemata jäänud sääskede arv, mis mõlemad on suuremad kui viis paralleelkatse (nõu) kohta.

48. Dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetodite kohaldamiseks tuleks väljaarenemise määra väärtused kõigepealt teisendada arkussiinus-ruutjuureteisenduse või Tukey-Freemani teisenduse abil, et saada ligikaudne normaaljaotus ja võrdsustada variatsioonid. Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpse testi (Bonferroni) või Mantel-Haentzali testi võib kasutada absoluutsete sageduste kasutamisel. Arkussiinus-ruutjuure-teisendust kohaldatakse, arvutades väljaarenemise määra ruutjuure siinuse pöördarvu ($\sin^{-1}$).

49. Väljaarenemismäärade puhul arvutatakse EC_x väärtused regressioonanalüüsiga (näiteks probit-, logit- või Weibulli mudel (28)). Kui regressioonanalüüs ebaõnnestub (näiteks kui on vähem kui kaks osalist vastust), võib kasutada muid mitteparameetrilisi meetodeid, näiteks libisevat keskmist või lihtsat interpolatsiooni.

Arengu kiirus

50. Keskmine arengu aeg väljendab keskmist ajavahemikku vastsete lisamise (katsepäev 0) ja sääskede katsekohordi väljaarenemise vahel (tegeliku

▼M6

arenguaja arvutamisel tuleb arvesse võtta vastsete vanust katsesse sisseviimise ajal). Arengu kiirus (ühik: 1/päev) on pöördvõrdeline arengu ajaga ja väljendab vastsete arengu seda osa, mis toimub ühe päeva jooksul. Kõnealuste sette mürgisuse hindamise uuringute puhul eelistatakse arengu kiirust, kuna selle hajuvus on väiksem ja homogeensem ning normaaljaotusele lähedasem kui arenguaja puhul. Seega võib arengu kiiruse puhul kasutada tugevamaid parameetrilisi testimismeetodeid, mida ei saa kasutada arenguaja puhul. Arengu kiiruse kui pideva vastuse jaoks saab EC_x väärtusi hinnata regressioonanalüüsiga (näiteks 29, 30). Arengu kiiruse keskväärtusele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) võib määrata ANOVA meetoditega, nt Dunnetti või Williamsi testiga. Kuna isassääsed arenevad välja emassääskedest varem (st nende arengu kiirus on suurem), on mõttekas arvutada arengu kiirus eraldi kummastki soost sääskede jaoks, lisaks üldisele sääskede arengu kiirusele.

51. Statistiliste testide puhul eeldatakse, et kontrolli päeval x täheldatud sääsed on välja arenenud keskmisel ajavahemikul päeva x ja päeva x – 1 vahel (l = kontrollimiste vahelise ajavahemiku pikkus, tavaliselt üks päev). Keskmine arengu kiirus nõu kohta ($\bar{x}$) arvutatakse järgmise võrrandi alusel:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

kus

$\bar{x}$ – keskmine arengu kiirus nõu i kohta

i kontrollidevahemiku indeks;

m kontrollivahemike maksimaalne arv

f_i – kontrollivahemikul i väljaarenenud sääskede arv

n_e eksperimendi lõpuks väljaarenenud sääskede koguarv (Σf_i)

x_i ajavahemikul i väljaarenenud sääskede arengu kiirus,

$$x_i = 1/\text{päev}_i - \frac{l_i}{2}$$

kus:

$päev_i$ kontrolli päev (päevade arv pärast vastsete sisestamist katsesse)

l_i kontrollivahemiku i pikkus (päevades, tavaliselt 1 päev).

Sooline jaotumine

52. Soolist jaotumist kirjeldavad binaarsed-andmed ja seepärast tuleks seda hinnata Fisheri täpse testi või muude sobivate meetoditega. *C. riparius*'e looduslik sugude suhtarv on 1, st isas- ja emasloomade arv on võrdne. Mõlemas põlvkonnas tuleks soolise jaotumise andmeid töödelda ühte moodi. Kuna sääskede maksimaalne arv nõus (st 20) on korraliku statistilise analüüsi jaoks liiga väike, leitakse kõikidest ühe kontsentratsiooni

▼M6

paralleelkatsetest väljaarenenud elusate isas- ja emassääskede summaarsed arvud. Neid teisendamata andmeid võrreldakse (lahusti) kontrolli või koondatud kontrolli andmetega 2 × 2 kooslustabelis.

Paljunemine

53. Paljunemist hinnatakse sigivuse kaudu, mida iseloomustatakse munanööride arvuga emassääse kohta. Täpsemalt, paljunduspuuris munetud munanööride arv jagatakse elusate ja kahjustamata emassääskede arvuga, kes viidi sellesse puuri. Sigivusele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) võib määrata ANOVA meetoditega, nt Dunnetti või Williamsi testiga.

54. Munanööride fertiilsust kasutatakse selleks, et määrata viljakate munade arv ühe emassääse kohta. Paljunduspuuris munetud fertiilsete munanööride arv jagatakse elusate ja kahjustamata emassääskede arvuga, kes viidi sellesse puuri. Viljakusele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) võib määrata ANOVA meetoditega, nt Dunnetti või Williamsi testiga.

Katseprotokoll

55. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline olek ja füüsikalis-keemilised omadused (lahustuvus vees, aururõhk, log K_{ow}, jaotuskoefitsient mullas (või settes, kui see on määratud), stabiilsus vees ja settes jne);

— kemikaali identifitseerimisandmed (tavanimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sh puhtus ja uuritava kemikaali kvantitatiivse määramise meetod.

Katseliik:

— kasutatud katseorganismid: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;

— teave selle kohta, kuidas munamasse ja vastseid käideldi;

— teave 1. põlvkonna väljaarenenud valmikute käitlemise kohta (imuri vms abil) (vt 5. liide);

— katseorganismide vanus 1. ja 2. põlvkonna katsenõudesse viimise ajal.

Katsetingimused:

— kasutatud sete, s.o looduslik või spetsiaalselt koostatud (kunstlik) sete;

— looduslik sete: setteproovide võtmise koha asukoht ja kirjeldus, kaasa arvatud saastelugu (võimaluse korral); sette omadused: pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria (kui see on asjakohane);

— spetsiaalselt koostatud sete: sette valmistamine, koostisosad ja omadused (orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, niiskus jne, mis määrati katse alguses);

— katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (hapnikusisaldus, pH, karedus jne, mis määrati katse alguses);

▼**M6**

— settekihi paksus ja seda katva veekihi paksus katsenõudes ja kristallisaatoris;

— katva veekihi ja poorivee ruumala; märja settekihi mass koos pooriveega ja ilma pooriveeta katsenõudes ja kristallisaatoris;

— katsenõud (materjal ja suurus);

— kristallisaatorid (materjal ja suurus);

— paljunduspuurid (materjal ja suurus);

— põhilahuse valmistamise meetod ja uuritud kontsentratsioonide saamine katsenõudes ja kristallisaatorites;

— uuritava kemikaali viimine katsenõudesse ja kristallisaatoritesse: kasutatud kontsentratsioonid, paralleelkatsete arv ja lahusti, vajaduse korral;

— katsenõude inkubatsiooni tingimused: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus, aereerimine (mulle sekundis);

— inkubatsioonitingimused paljunduspuurides ja kristallisaatorites: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus;

— munanööride inkubeerimise tingimused mikrotiiterplaatidel (vm nõudes): temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus;

— üksikasjalik teave söötmise kohta, sh sööda tüüp, valmistamine, kogus ja söötmise ajakava.

Tulemused:

— uuritava aine nimikontsentratsioonid, mõõdetud kontsentratsioonid ja kõigi analüüside tulemused, millega määrati uuritava kemikaali kontsentratsiooni katsenõus ja kristallisaatoris;

— vee kvaliteet katsenõus ja kristallisaatoris, s.o pH, temperatuur, lahustunud hapnik, karedus ja ammoniaak;

— aurustunud katsevee asendamine katsenõus, kui seda tehti;

— väljaarenenud isas- ja emassääskede arv iga 1. ja 2. põlvkonna nõu ja iga päeva kohta;

— elusate ja väljaarenenud sääskede sooline jaotumine igal katses kasutatud kontsentratsioonil 1. ja 2. põlvkonnas;

— iga 1. ja 2. põlvkonna nõu kohta nende vastsete arv, kellest sääski ei arenenud;

— 1. ja 2. põlvkonnas väljaarenemise protsent/osakaal iga paralleelkatse ja kontsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);

— 1. ja 2. põlvkonnas elusate ja väljaarenenud sääskede keskmine arengukiirus igas paralleelkatses ja igal kontsentratsioonil (isas- ja emassääsed eraldi ja ka koos);

— kristallisaatorisse munetud munanööride arv paljunduspuuri ja iga päeva kohta;

▼**M6**

— iga munanööri kirjeldus (suurus, kuju ja viljakus);

— sigivus – munanööride üldarv paljunduspuuridesse pandud emassääskede üldarvu kohta;

— viljakus – viljakate munanööride üldarv paljunduspuuridesse pandud emassääskede üldarvu kohta;

— mürgisuse näitajate hinnangud, näiteks EC_x (ja selle usaldusvahemik), täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) ja selle määramiseks kasutatud statistilised meetodid;

— tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast metoodikast kõrvalekaldumise võimalik mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

(1) Käesoleva lisa peatükk C.28 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud vee kasutamisega”.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) Fleming, R. *et al*. (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662-2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221-230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345-350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47-57.

(15) Käesoleva lisa peatükk C.27 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud sette kasutamisega".

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353-361.

(20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291-3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482-491.

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94-102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213-221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485-1494.

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298-312.

(31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165-1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1-9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼**M6**

1. liide

Mõisted

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse järgmisi mõisteid järgmises tähenduses:

Kemikaal – aine või segu.

Spetsiaalselt koostatud sete *ehk taastatud, tehislik või sünteetiline sete* – selline materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks.

Kattev veekiht – vesi, mis on pandud katsenõus sette peale.

Poorivesi – vesi, mis asub sette- ja pinnaseosakeste vahelises ruumis.

Rikastatud vesi – katses kasutatav vesi, millele on lisatud uuritav kemikaal.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M6

2. liide

***Chironomus riparius*'e kasvatamist käsitlevad soovitused**

1. *Chironomus*'e vastseid võib kasvatada kristallisatsiooninõus või suuremas mahutis. Mahuti põhi kaetakse ligikaudu 5–10 mm paksuse peene kvartsliiva kihiga. Diatomiit (näiteks Merck, Art 8117) on samuti tõendatult sobiv substraat (piisab õhemast kihist, isegi mõnest millimeetrist). Seejärel lisatakse sobivat vett mitme cm paksuse kihina. Vett tuleks vajaduse korral lisada aurumiskadude asendamiseks ja kuivamise vältimiseks. Vee võib vajaduse korral välja vahetada. Tuleks tagada kerge aereerimine. Vastsete kasvatamise nõusid tuleks hoida sobivas puuris, mis takistab väljaarenenud täiskasvanud isendite väljapääsu. Puur peaks olema piisavalt suur, et võimaldada väljaarenenud valmikute parvedesse kogunemist, vastasel juhul ei pruugi toimuda paljunemist (miinimumsuurus on ligikaudu 30 × 30 × 30 cm).

2. Puure tuleks hoida toatemperatuuril või püsiva keskkonnaga ruumis temperatuuril 20 ± 2 °C 16-tunnise valgustusperioodiga (intensiivsus ligikaudu 1 000 luksi) ja 8 tunni pimedusega. On teada, et vähem kui 60 %-line suhteline õhuniiskus võib paljunemist takistada.

Lahjendusvesi

3. Võib kasutada mis tahes looduslikku või sünteetilist vett. Enamasti kasutatakse kaevuvett, deklooritud kraanivett ja tehislikke kasvukeskkondi (näiteks Elendti kasvukeskkond M4 või M7, vt allpool). Vett tuleks enne kasutamist aereerida. Vajaduse korral võib kultuuri kasvuvett uuendada, eemaldades kasutatud vee kultuuri kasvunõudest ettevaatlikult valamise teel või sifooniga, kahjustamata vastsete kestasid.

Vastsete söötmine

4. *Chironomus*'e vastseid tuleks sööta helbelise kalasöödaga (Tetra Min®, Tetra Phyll® või muu samalaadne kaubanduslik kalasööda tootemark) koguses ligikaudu 250 mg nõu kohta päevas. Sööta võib anda kuiva jahvatatud pulbrina või suspensioonina vees: 1,0 g helbelist kalasööta lisatakse 20 ml lahjendusveele ja see segatakse homogeense segu saamiseni. Seda preparaati võib sööta koguses 5 ml nõu kohta päevas (loksutage enne kasutamist). Vanemad vastsed võivad vajada rohkem sööta.

5. Söötmist kohandatakse vee kvaliteediga. Kui kultuuri kasvukeskkond muutub häguseks, tuleks sööda hulka vähendada. Sööda lisamist tuleks hoolikalt jälgida. Liiga vähe sööta põhjustab vastsete rände veesamba suunas ning liiga palju sööta hoogustab mikroobide tegevust ja vähendab vee hapnikusisaldust. Mõlemad tingimused võivad vähendada kasvu kiirust.

6. Uute kultuuri kasvunõude valmisseadmisel võib lisada ka mõne rohevetika (näiteks *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) rakke.

Väljaarenenud valmikute söötmine

7. Mõned teadlased on soovitanud väljaarenenud valmikute söötmiseks kasutada küllastunud sahharoosilahuses niisutatud puuvillast lappi.

▼M6

Väljaarenemine

8. Temperatuuril 20 ± 2 °C hakkavad ligikaudu 13–15 päeva möödumisel vastsete kasvatamise nõudest väljuma valmikud. Isased on tänu sulgjatele tundlatele ja kõhnemale kehale kergesti äratuntavad.

Munamassid

9. Kui valmikud on paljunduspuuris, tuleks kõiki vastsete kasvatamise nõusid kontrollida kolm korda nädalas sinna želatiinjate munamasside lisandumise suhtes. Kui leitakse munamass, tuleks see hoolikalt kõrvaldada. See tuleks üle kanda väiksele tassile, mis sisaldab paljundusvee proovi. Munamasse kasutatakse uue kasvunõu kasutusele võtmiseks (näiteks 2–4 munamassi nõu kohta) või mürgisuse katsetes.

10. Esimese kasvujärgu vastsed peaksid kooruma 2–3 päeva pärast.

Uute kasvunõude ülesseadmine

11. Kui kultuurid on loodud, peaks iga nädal (või katsenõuetest olenevalt väiksema sagedusega) olema võimalik vastsete uute kasvunõude ülesseadmine, kõrvaldades vanemad nõud pärast täiskasvanud sääskede väljaarenemist. Seda süsteemi kasutades saadakse minimaalse vaevaga regulaarne valmikute varu.

Katselahuste M4 ja M7 valmistamine

12. Elendt (1990) on kirjeldanud kasvukeskkonda M4. Kasvukeskkond M7 valmistatakse samal viisil kui kasvukeskkond M4, v.a tabelis 1 nimetatud ainete puhul, mille kontsentratsioon kasvukeskkonnas M7 on kasvukeskkonnaga M4 võrreldes neli korda madalam. Katselahust ei tohiks koostada Elendti ja Biasi (1990) järgi, kuna põhilahuste valmistamiseks ei ole antud $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 ja K_2HPO_4 kontsentratsioon sobiv.

Kasvukeskkonna M7 valmistamine

13. Iga põhilahus (I) valmistatakse eraldi ja kombineeritud põhilahus (II) valmistatakse kõnealustest põhilahustest (I) (vt tabel 1). Kasvukeskkonna M7 valmistamiseks võetakse 50 ml kombineeritud põhilahust (II), lisatakse iga makrotoitaine põhilahuse kogused, mis on esitatud tabelis 2, ja täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse deioniseeritud veele kolme vitamiini, nagu on näidatud tabelis 3, ja lõplikule M7 kasvukeskkonnale lisatakse vahetult enne selle kasutamist 0,1 ml kombineeritud vitamiinide põhilahust. Vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena. Kasvukeskkonda aereeritakse ja see stabiliseeritakse.

Tabel 1.

Kasvukeskkondade M4 ja M7 mikroelementide põhilahused

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need deioniseeritud veega 1 liitrini		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M 4	M 7	M 4	M 7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need deioniseeritud veega 1 liitrini		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M 4	M 7	M 4	M 7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Need ained on M4 ja M7 puhul erinevad, nagu on eespool viidatud.
(2) Need lahused valmistatakse eraldi, valatakse seejärel kokku ja autoklaavitakse viivitamata.

Tabel 2.

Kasvukeskkondade M4 ja M7 makrotoitainete põhilahused

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav makrotoitainete põhilahuste kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l))
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCI	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Tabel 3.

Kasvukeskkondade M4 ja M7 vitamiinide põhilahus

Ühe vitamiinide põhilahuse valmistamiseks valatakse kokku kõik kolm vitamiinilahust.

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav vitamiinide põhilahuse kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l))
Tiamiinvesinikkloriid	750	0,1	0,075
Tsüanokobalamiin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiin	7,5	0,1	0,00075

KIRJANDUS

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, Water Research, 24: 1157-1167.

▼M6

3. liide

Spetsiaalselt koostatud sette valmistamine

SETTE KOOSTIS

Spetsiaalselt koostatud sette koostis peaks olema järgmine:

Koostisosa	Kirjeldus	Sette kuivmassi protsent
Turvas	Turbasamblaturvas, mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0, nähtavad taimeosad puuduvad, peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) ja õhu käes kuivatatud	4–5
Kvartsliiv	Tera suurus: > 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisisaldus ≥ 30 %	20
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 (± 0,5)
Kaltsiumkarbonaat	$CaCO_3$, pulbriline, keemiliselt puhas	0,05–0,1
Vesi	Juhtivus ≤ 10 μS/cm	30–50

VALMISTAMINE

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Valmistatakse vajaliku turbapulbrikoguse suspensioon deioniseeritud vees, kasutades tõhusat homogenisaatorit. Selle suspensiooni pH reguleeritakse $CaCO_3$ abil vahemikku 5,5 ± 0,5. Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks päeva temperatuuril 20 ± 2 °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent. pH mõõdetakse uuesti ja see peaks olema 6,0 ± 0,5. Seejärel segatakse turba suspensioon muude koostisosadega (liiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH mõõdetakse uuesti ja reguleeritakse vajaduse korral $CaCO_3$ abil vahemikku 6,5–7,5. Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Enne, kui spetsiaalselt koostatud setet kasutatakse surusääsklastele mürgisuse katses, on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus.

SÄILITAMINE

Tehisliku sette valmistamiseks kasutatavaid kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Spetsiaalselt koostatud (märga) setet ei tohiks enne selle katses kasutamist säilitada. Seda tuleks kasutada viivitamata pärast seitsmepäevast kohandamisperioodi, millega selle valmistamine lõpetatakse.

KIRJANDUS

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

▼**M6**

4. liide

Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused

KOOSTISOSA	KONTSENTRATSIOONID
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Karedus $CaCO_3$-na	< 400 mg/l (*)
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

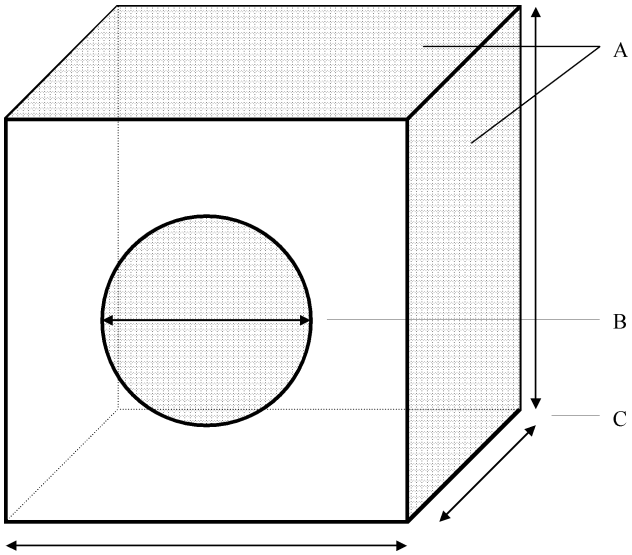
(*) Kui kahtlustatakse karedust tekitavate ioonide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks nimetatud olukorras kasutada Elendti kasvukeskkonda M4).

▼**M6**

5. liide

Juhised katse tegemiseks

Paljunduspuuri näide:



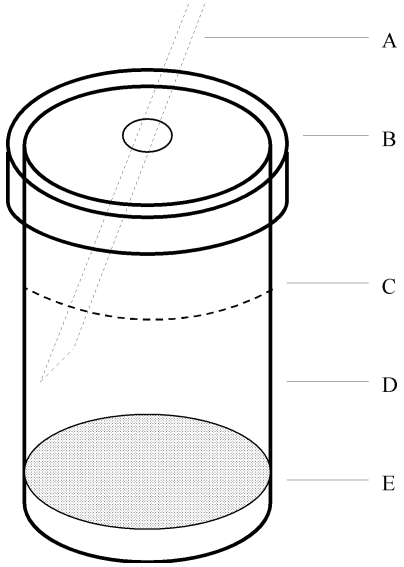
A: ažuurne riie puuri peal ja vähemalt ühel küljel (võrgusilma suurus ca 1 mm)

B: ava väljaarenenud valmikute puuri panemiseks ja munetud munanööride väljavõtmiseks kristallisaatorist (ei ole näidatud sellel pildil).

C: paljunduspuuri mõõtmed on vähemalt 30 × 30 × 30 cm (pikkus × laius × kõrgus).

▼**M6**

Katsenõu näide:



A: Pasteuri pipett katva veekihi aereerimiseks

B: klaaskaas, et hoida ära väljaarenenud sääskede väljapääsemine

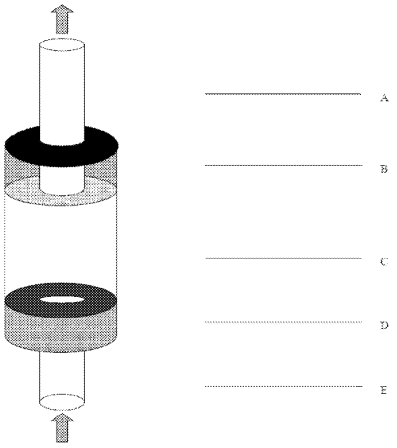
C: vee pinnakiht

D: katsenõu (vähemalt 600 ml keeduklaas)

E: settekiht

▼**M6**

Imur sääsevalmikute püüdmiseks (nooled näitavad õhuvoolu suunda):



A: klaastoru (sisediameeter ligikaudu 5 mm), mis on ühendatud ise-eeltäituva imipumbaga

B: vulkaniseeritud kummist kork, läbi mille läheb klaastoru A. Seestpoolt on klaastoru A avaus kaetud vati ja marliga (võrgusilma suurus ligikaudu 1 mm^2), et vältida sääskede kahjustamist imurisse tõmbamisel.

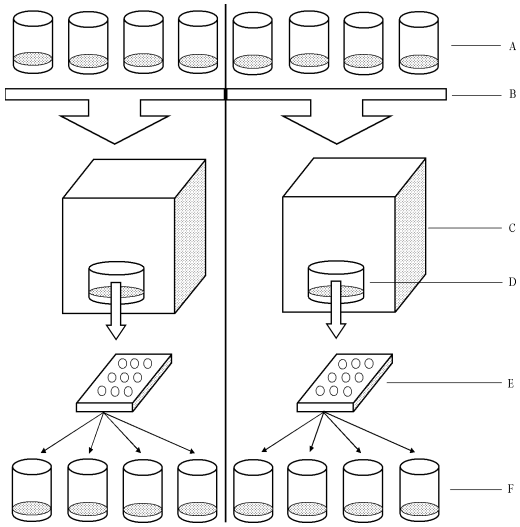
C: läbipaistev nõu (plastikust või klaasist, pikkus ligikaudu 15 cm) kogutud sääskede jaoks.

D: vulkaniseeritud kummist kork, läbi mille läheb toru E. Sääskede lahtilaskmiseks paljunduspuuri võetakse nõult C ära kork D.

E: plastikust või klaasist toru (sisediameeter ligikaudu 8 mm) valmikute kogumiseks katsenõust.

▼**M6**

Elutsüklit hõlmava katse skeem:



A: 1. põlvkond – katsenõud, mis sisaldavad sette-vee süsteemi, 8 paralleelkatset, 20 esimese kasvujärgu vastset igasse nõusse

B: neli katsenõud paljunduspuuri kohta, A ja B

C: paljunduspuurid (A ja B) valmikute parvedesse kogunemiseks, paaritumiseks ja munemiseks

D: kristallisaatorid munanööride paigutamiseks

E: mikrotiiterplaat, üks süvend iga munanööri jaoks

F: 2. põlvkond – katsenõud, mis sisaldavad sette-vee süsteemi, 8 paralleelkatset, 20 esimese kasvujärgu vastset igasse nõusse.

▼**M6**

C.41. **KALADE SUGULISE ARENGU KATSE**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 234 (2011). See põhineb ühel 1998. aasta otsusel töötada välja uued või ajakohastada olemasolevad katsemeetodid, millega saaks välja sõeluda võimalikke endokriinsüsteemi kahjustajaid. Kalade sugulise arengu katse (*Fish Sexual Development Test*, FSDT) tunnistati paljulubavaks katsemeetodiks, millega on hõlmatud nii östrogeeni- kui ka androgeenisarnaste kemikaalide toime suhtes tundlikud kalade arengu eluetapid. Katsemeetod läbis laboritevahelise valideerimise ajavahemikul 2006-2010, mille käigus valideeriti jaapani riisikala (*Oryzias latipes*), vöötdaanio (*Danio rerio*) ja ogalik (*Gasterosteus aculeatus*) ning osaliselt valideeriti tüse tõmpnina (*Pimephales promelas*) (41, 42, 43). Käesolevas katsejuhendis on käsitletud jaapani riisikala, ogalikku ja vöötdaaniot. Käesoleva katse-eeskirjaga põhimõtteliselt laiendatakse OECD katsejuhendit 210 (Mürgisuse katse varases elujärgus kaladega) (1), mille puhul jätkatakse kalade kokkupuudet kemikaaliga kuni nende seksuaalse diferentseerumiseni, s.t ligikaudu 60. päevani pärast koorumist (*days post-hatch*, dph) jaapani riisikala, ogaliku ja vöötdaanio puhul (muude, edaspidi valideeritavate liikide puhul võib kokkupuuteaeg olla lühem või pikem), ning lisatakse sisesekretsiooni suhtes tundlikke näitajaid. Kalade sugulise arengu katsega hinnatakse oletatavate endokriinsüsteemi kahjustavate kemikaalide (nt östrogeenid, androgeenid ja steroidogeneesi inhibiitorid) mõju ja võimalikke kahjulikke tagajärgi kalade sugulisele arengule varasel eluetapil. Kahe tähtsaima endokriinsüsteemi näitaja, vitellogeniini kontsentratsiooni ja fenotüübi soolise jaotumise suhtarvu määramise kombinatsioon võimaldab selle katsega määrata uuritava kemikaali toimemehhanismi. Tänu fenotüübilise soolise jaotumise populatsioonist sõltuvale muutumisele saab kalade sugulise arengu katset kasutada ohtude ja riskide hindamiseks. Siiski, kui katse tehakse ohu või riski hindamiseks, ei tohiks valida ogalikku, kuna senised valideerimisandmed on näidanud, et selle liigi korral on fenotüübilise soolise jaotumise muutused uuritavate kemikaalide toimel olnud ebatavalised.

2. Katse-eeskiri põhineb kalade vee kaudu kokkupuutesse viimisel uuritavate kemikaalidega sugulise arengu labiilse perioodi jooksul, kus kala peaks olema kõige tundlikum seksuaalset arengut häirivate ja endokriinsüsteemi kahjustavate kemikaalide mõju suhtes. Mõõdetakse endokriinsüsteemist tingitud arenguhäirete kaht peamist näitajat – vitellogeniini kontsentratsiooni ja sugunäärmete histoloogia põhjal soolise jaotumise suhtarve. Sugunäärmete histopatoloogia (munarakkude ja spermatogeneesi määravate rakkude hindamine ja etappidesse jaotamine) on valikuline. Lisaks määratakse geneetiline sugu kui võimalik (nt Jaapani riisikala ja ogaliku puhul). Geneetiliste soomarkerite olemasolu on suur eelis, kuna see suurendab soolise jaotumise statistika võimsust ja võimaldab kindlaks teha individuaalset fenotüübilist soo arengu pöördumist. Muud apikaalsed näitajad, mis tuleks mõõta, on koorumise kiirus, elulemus, pikkus ja kehamass. Meetodit võib kohandada muudele liikidele kui eespool nimetatud, tingimusel et muu liik on läbinud valideerimise, mis on võrdne jaapani riisikala, ogaliku ja vöötdaanio puhul tehtuga, et kontrollrühma kalad on katse lõpuks sooliselt diferentseerunud, et vitellogeniini tase on piisavalt kõrge, et uuritava kemikaali põhjustatud muutused oleksid avastamiseks piisavalt suured, ja et katsesüsteemi tundlikkus on kontrollitud endokriinsüsteemi mõjutavate võrdluskemikaalidega ((anti-)östrogeenid, (anti-)androgeenid, aromataasi inhibiitorid jne). Lisaks sellele peaksid kõik muu liigiga tehtud kalade sugulise arengu katse valideerimisaruanded olema OECD poolt läbi vaadatud ja valideerimise tulemus tunnistatud rahuldavaks.

▼M6

Lähtekaalutlused ja piirangud

3. Vitellogeniini sünteesitakse tavaliselt munevate selgroogsete emasloomade maksas vastuseks veres ringlevale endogeensele östrogeenile (2). See on munarebu valkude eelkäija ja pärast sünteesimist maksas liigub ta verega munasarjadesse, kus see seotakse ja seda modifitseeritakse munade arengu käigus. Vitellogeniini süntees on väga piiratud (kuigi siiski avastatav) ebaküpsetes kalades ja isaskalades, kuna nende vereringes ei ole piisavalt östrogeeni. Kuid maks on võimeline seda sünteesima ja verre eritama vastuseks eksogeense östrogeeniga stimuleerimisele (3, 4, 5).

4. Vitellogeniini mõõtmist kasutatakse östrogeensete, antiöstrogeensete, androgeense toimemehhanismiga ja steroidogeneesi segavate uuritavate kemikaalide, näiteks aromataasi inhibiitorite avastamiseks. Östrogeensete kemikaalide avastamine on võimalik vitellogeniini indutseerimise mõõtmisega isaskalades ja see on teaduslikes eelretsenseeritud ajakirjades hästi tõendatud. Vitellogeniini induktsioon on tõendatud pärast kokkupuudet aromatiseeritavate androgeenidega (6, 7). Kui emasloomade veres vähendatakse östrogeeni taset, näiteks sellega, et inhibeeritakse ensüüm aromataasi, mis muundab endogeense androgeeni looduslikuks östrogeeniks 17β-östradiooliks, põhjustab see vitellogeniini kontsentratsiooni vähenemise, mida kasutatakse selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis inhibeerivad aromataasi või laiemalt üldse steroidogeneesi (33). Pärast kokkupuudet östrogeeniga või aromataasi inhibiitoriga vitellogeniini tasemes ilmneva muutuse bioloogiline olulisus on hästi tõendatud (8, 9). Siiski on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus.

5. Välja on töötatud mitmed mõõtmismeetodid, mis on standarditud igapäevaseks kasutamiseks vitellogeniini taseme mõõtmisel üksikult kalalt võetud vere-, maksa-, kogu keha või pea/saba homogenaadi proovides. See kehtib vöötdaanio, ogaliku ja jaapani riisikala puhul, samuti osaliselt valideeritud tüseda tõmpnina puhul; vitellogeniini immunokeemiliseks mõõtmiseks on kättesaadavad liigispetsiifilised ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodid (5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Jaapani riisikala ja vöötdaanio puhul on hea korrelatsioon vereplasma-, maksa- ja homogenaadiproovides mõõdetud vitellogeniinisisalduse vahel, kuigi homogenaadis kipub sisaldus olema mõnevõrra väiksem kui plasmas (17, 18, 19). 5. liites on esitatud soovitatavad proovivõtumeetodid vitellogeniini määramiseks.

6. Fenotüübikohase soolise jaotumise (sugudevahelise suhte) muutus on näitaja, mis iseloomustab soo arengu pöördumist. Põhimõtteliselt võivad arenevate kalade sugu mõjutada östrogeeni, antiöstrogeeni, androgeeni, antiandrogeeni või steroidogeneesi inhibiitori omadustega kemikaalid (20). On näidatud, et soo arengu pöördumine on vöötdaanio korral osaliselt pöörduv (21) pärast kokkupuudet östrogeenisarnase kemikaaliga, samas kui soo arengu pöördumine pärast kokkupuudet androgeenisarnase kemikaaliga on püsiv (30). Sugu on määratletud järgmiselt: emane, isane, vahesugu (interseksuaal; ühes sugunäärmes on nii ovotsüüte kui ka spermatogeneesi rakke) või diferentseerumata, mis määratakse kala sugunäärmete individuaalse histoloogilise uuringuga. Juhendid on esitatud 7. liites ja OECD juhenddokumendis „Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads” (Juhenddokument kalade endokriinsüsteemiga seotud sugunäärmete histopatoloogia diagnoosimiseks) (22).

7. Geneetilist sugu uuritakse geneetiliste markerite kaudu, kui need on kõnealusel kalaliigil olemas. Jaapani riisikala emase XX- või isase XY-geene saab määrata polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil või Y-kromosoomiga

▼M6

seotud DM-domeeni geeni määramisega (DMY-negatiivne või -positiivne), nagu on kirjeldatud töödes (23, 24). Ogaliku puhul on olemas samaväärne PCR-meetod geneetilise soo määramiseks, mida on kirjeldatud 10. liites. Kui geneetilist sugu saab individuaalselt siduda fenotüübikohase sooga, suureneb testi tõhusus, ja seepärast tuleks geneetilist sugu määrata liikidel, kelle jaoks on dokumenteeritud geneetilise soo markerid.

8. Kaks peamist endokriinsüsteemi iseloomustavat näitajat, vitellogeniin ja sooline jaotumine), võimaldavad koos kindlaks määrata kemikaali endokriinse toimemehhanismi (tabel 1). Sooline jaotumine on populatsiooni asjakohane biomarker (25, 26) ja teatavate hästi uuritud toimemehhanismide puhul saab kalade sugulise arengu katse tulemusi kasutada ohtude ja riskide hindamiseks, kui reguleeriv asutus peab seda vajalikuks. Need toimemehhanismid on praeguse seisuga östrogeenid, androgeenid ja steroidogeneesi inhibiitorid.

Tabel 1.

Endokriinsete näitajate muutumine mitmesuguse toimemehhanismiga kemikaalide mõjul:

VTG – vitellogeniin, ↑ – suureneb, ↓ – väheneb, „—” – ei ole uuritud

Toimemehhanism	VTG ♂	VTG ♀	Sooline jaotumine	Viited
Nõrk östrogeeni agonist	↑	↑	↑♀ või ↑dif-mata	(27, 40)
Tugev östrogeeni agonist	↑	↑	↑♀ või ↑dif-mata, mitte ♂	(28, 40)
Östrogeeni antagonist	—	—	↑♀, ↑dif-mata	(29)
Androgeeni agonist	↓ või —	↓ või —	↑ ♂, mitte ♀	(28, 30)
Androgeeni antagonist	—	—	↑♀ ↑vahesugu	(31)
Aromataasi inhibiitor	↓	↓	↓♀	(33)

9. Kalade sugulise arengu katse ei hõlma kalade paljunemise eluperioodi, seepärast tuleks kemikaali, mis võib mõjutada viljakust madalamal kontsentratsioonil, kui kasutatakse seksuaalse arengu katses, uurida katses, mis hõlmab paljunemist.

10. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

11. Kalade sugulise arengu *in vivo* katse eesmärk on teha kindlaks androgeensete või östrogeensete ning samuti antiandrogeensete, antiöstrogeensete ja steroidogeneesi inhibeerivate omadustega kemikaale. Kalade sugulise arengu katse valideerimise faasid (1 ja 2) hõlmasid östrogeenseid, androgeenseid ja steroidogeneesi pärssivaid kemikaale. Östrogeeni ja androgeeni antagonistide mõju kalade sugulise arengu katsele võib näha tabelist 1, kuid nende toimemehhanisme on senini vähem uuritud.

KATSE PÕHIMÕTE

12. Katses viiakse kalamaimud, alates äsja viljastatud marjateradest kuni sugulise diferentseerumise lõpuni, kokkupuutesse vees lahustatud uuritava kemikaali vähemalt kolme kontsentratsiooniga. Tuleks kasutada läbivooluga katset, välja arvatud juhtudel, kus see ei ole võimalik kemikaali kättesaadavuse või omaduste, nt piiratud lahustuvuse tõttu. Katse algab värskelt viljastatud marjaterade (enne looteketta jagunemist) panemisega katsekambritesse. Kambrite täitmist iga kalaliigi puhul on kirjeldatud punktis 27. Valideeritud kalaliikide (jaapani riisikala, ogalik ja vöötdaanio)

▼M6

puhul lõpetatakse katse 60. päeval pärast koorumist. Katse lõpus surmatakse kõik kalad humaansel viisil. Igast kalast võetakse bioloogiline proov (vereplasma, maksa või pea/saba homogenaat) vitellogeniini määramiseks ja ülejäänud osa fikseeritakse sugunäärmete histoloogiliseks hindamiseks, et määrata fenotüübikohane sugu; soovi korral võib teha histopatoloogia uuringu (nt sugunäärmete arenguetapi määramine, vahesugulisuse raskusaste). Bioloogiline proov (pärakuuim või seljauim) geneetilise soo määramiseks võetakse liikide puhul, kellel on sobivad sellekohased markerid (9. ja 10. liide).

13. Ülevaade asjakohastest liigispetsiifilistest katsetingimustest iga valideeritud liigi (jaapani riisikala, ogalik ja vöötdaanio) jaoks on esitatud 2. liites.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

14. Kättesaadavad peaksid olema ägeda mürgisuse katse või muu lühiajalise mürgisuskatse tulemused [nt katsemeetod C.14 (34) ja OECD katsejuhend nr 210 (1)], eelistatavalt samade liikide kohta, kes on valitud käesoleva katse jaoks. See eeldab, et on teada uuritava kemikaali lahustuvus vees ja aururõhk ning on olemas usaldusväärne analüütiline meetod kemikaali kvantitatiivseks mõõtmiseks katsekambrites teadaoleva ja dokumenteeritud täpsusega ning avastamispiiriga.

15. Lisaks on kasulik teada järgmist: struktuurvalem, kemikaali puhtus, püsivus vees ja valguse käes, pKa, P_{OW} ja kiire biolagundatavuse katse tulemused (vt katsemeetod C.4) (35).

Katse nõuetekohasuse tingimused

16. Katse nõuetekohasuse tõendamisel arvestatakse järgmist:

— lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastumisel saadavast väärtusest (*air saturation value*, ASV) kogu katse jooksul;

— vee temperatuur ei tohi kemikaaliga kokkupuute ajal eri katsekambrites kunagi erineda rohkem kui ± 1,5 °C ja tuleks hoida katsealusele liigile ettenähtud temperatuurivahemikus (2. liide);

— Uuritava kemikaali määramiseks peaks olema valideeritud meetod, mille määramispiir on oluliselt allpool nominaalset kontsentratsiooni, ja tuleks koguda tõendeid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % mõõdetud keskmisest väärtusest;

— viljastatud marjaterade üldine ellujäämine kontrollkatsetes ja, kus see on oluline, ka ainult lahustit sisaldavates kontrollkatsetes ei tohiks olla väiksem kui 2. liites määratletud piirid;

— vastuvõetavuse kriteeriumid, mis on seotud kasvuga ja soolise jagunemisega katse lõpetamisel, põhinevad kontrollrühmade andmetel (ühendatud lahusti kontrollrühmad ja vee kontrollrühmad, välja arvatud juhud, kui need erinevad oluliselt – siis ainult lahusti kontrollrühmad):

▼M6

		Jaapani riisikala	Vöötdaanio	Ogalik
Kasv	Kuivaks pühitud kala märgmass	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Pikkus (standardpikkus)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Sooline jaotumine (isasloomade või emasloomade %)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

— Kui kasutatakse lahustit, ei tohiks sellel olla statistiliselt olulist mõju kalade ellujäämisele ja see ei tohiks mõjutada endokriinsüsteemi ega avaldada muud negatiivset mõju varajastele eluetappidele, mida kontrollitakse lahusti kontrollrühmaga.

Kui katse nõuetekohasuse kriteeriumidest leitakse kõrvalekaldumisi, tuleks kaaluda nende mõju katseandmete usaldusväärsusele ja need kaalutlused tuleks esitada katseprotokollis.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Katsekambrid

17. Kasutada võib igasuguseid klaasist, roostevabast terasest või muust keemiliselt inertsest materjalist katsekambreid. Kambrite mõõtmed peaksid olema piisavalt suured, et oleksid täidetud laadimisnormi kriteeriumid (vt allpool). Katsekambrid soovitatakse paigutada katse läbiviimise piirkonnas juhuslikult. Eelistatav on selline plokkide randomiseeritud paigutus, kus igas plokis on esindatud iga kontsentratsioon; see on parem kui täielikult randomiseeritud paigutus. Katsekambrid tuleks varjestada soovimatute häirimiste eest.

Liigi valimine

18. Soovitatavad kalaliigid on esitatud 2. liites. Uue liigi lisamise kord on esitatud punktis 2.

Sugukalade pidamine

19. Sugukalade rahuldavate pidamistingimuste üksikasjad on esitatud OECD katsejuhendis nr 210 (1). Sugukaladele tuleks üks või kaks korda päevas anda sobivat sööta.

Embrüote ja vastsete käitlemine

20. Algul võivad embrüod ja vastsed kemikaaliga kokku puutuda suurde nõusse paigutatud väiksemates klaasist või roostevabast terasest kambrites, millel on võrkküljed, mis võimaldavad uuritava kemikaali lahuse voolamist läbi kambri. Keeristeta voolu läbi nende väikeste kambrite võib tekitada nii, et kambrid on riputatud kangi külge, mis liigutab neid üles ja alla, kuid hoiab organismid kogu aeg lahuses.

21. Kui peamises katsenõus on marjaterade hoidmiseks kasutatud marjaterade konteinereid, reste või võrke, tuleks pärast vastsete koorumist need tõkked eemaldada, välja arvatud sellised võrgud, mis tuleb säilitada kalade põgenemise vältimiseks. Kui vastseid on vaja ümber paigutada, ei tohiks nad õhuga kokku puutuda ning kalade väljatõstmiseks marjaterade konteinerist ei tohiks kasutada võrke. Selle ümberpaigutamise ajastamine erineb liigiti ja ümberpaigutamine ei pea alati olema vajalik.

▼M6

Vesi

22. Kasutada võib igasugust vett, milles katsealuse liigi kontrollrühma isendid püsivad elusana vähemalt sama hästi kui 3. liites kirjeldatud vees. Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Selle tagamiseks, et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katse tulemusi (näiteks uuritava kemikaaliga reageerimise kaudu) ega mõjutaks negatiivselt sugukarja võimet, tuleb veest perioodiliselt võtta proove analüüsimiseks. Kui lahjendamiseks kasutatav vesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks selles näiteks iga kolme kuu järel mõõta orgaanilise süsiniku üldsisaldust, elektrijuhtivust, pH-d ja hõljuvainete sisaldust. Raskmetallide (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), peamiste anioonide ja katioonide (nt Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) ja pestitsiidide sisaldust tuleks mõõta siis, kui vee kvaliteedi suhtes on kahtlusi. Keemilist analüüsi ja vee võtmist on kirjeldatud punktis 34.

Katselahused

23. Kui see on praktiliselt võimalik, tuleks kasutada läbivooluga süsteemi. Läbivooluga katsete puhul on vaja kasutada süsteemi, mis pidevalt lisab ja lahjendab uuritava kemikaali põhilahust (nt dosaatorpump, proportsionaalse lahjendamise seade ja küllastamissüsteem), et tekitada eri katsekambrites rida erinevaid kontsentratsioone. Põhilahuste ja lahjendamiseks kasutatava vee voolamise kiirust tuleb kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel ja see ei tohiks kogu uuringu jooksul varieeruda rohkem kui 10 %. Sobivaks peetakse voolukiirust, mis vastab vähemalt katsekambri viiekordsele ruumalale 24 tunni jooksul (1). Tuleks vältida plastiktorusid või muid materjale, mis võivad sisaldada bioloogiliselt aktiivseid kemikaale või adsorbeerida uuritavat kemikaali.

24. Põhilahus tuleks eelistatavalt valmistada ilma lahusteid kasutamata, lihtsalt uuritava aine segamise või loksutamisega lahjendamiseks kasutatavas vees, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid (nt segamist või ultraheli). Kui uuritav kemikaal on vees raskesti lahustuv, võib kasutada meetodeid, mida on kirjeldatud OECD juhenddokumendis veekeskkonda ohustava mürgisuse katsetamiseks raskesti lahustuvate ainete ja segude puhul (36). Lahusti kasutamist tuleks vältida, kuid mõnel juhul võib see olla vajalik sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks. Sobivad lahustid on esitatud publikatsioonis (36).

25. Poolstaatilisi katsetingimusi tuleks vältida, välja arvatud juhul, kui nende kasutamiseks esitatakse kaalukad põhjused, mis on seotud uuritava kemikaaliga (nt stabiilsus, piiratud kättesaadavus, suured kulud või ohud). Poolstaatilise meetodi korral võib järgida kahte erinevat uuendamise menetlust. Puhastesse kambritesse võib valmistada uued katselahused ning elus olevad marjaterad ja vastsed kanda ettevaatlikult üle uutesse kambritesse; teise võimalusena võib katseorganisme hoida samades katsekambrites ja uuendatakse osa katseveest (vähemalt kaks kolmandikku) iga päev.

KATSE KÄIK

Kokkupuutetingimused

Marjaterade kogumine ja kestus

26. Geneetilise hälbe vältimiseks kogutakse marjaterad vähemalt kolmelt kalade paarilt või rühmalt, segatakse ja valitakse katse alustamiseks välja juhuvalikuga. Kunstlikku viljastamist ogaliku puhul on kirjeldatud 11. liites. Katse peaks algama niipea kui võimalik pärast marjaterade viljastamist, embrüod oleks soovitatav viia katselahusesse enne looteketta jagunemise algust või

▼M6

võimalikult kiiresti pärast seda ning mitte hiljem kui 12 tundi pärast viljastamist. Katse peaks jätkuma seni, kuni suguline diferentseerumine kontrollrühmas on lõppenud (jaapani riisikala, ogaliku ja vöötdaanio korral 60 päeva pärast koorumist).

Marjaterade panemine katsesse

27. Viljastatud marjaterade arv katse alguses peaks iga kontsentratsiooni kohta olema vähemalt 120, mis jagatakse vähemalt 4 paralleelkatse vahel (kontrolliks on lubatud võtta ruutjuur marjaterade arvust katses). Marjaterad tuleks jaotada kontsentratsioonitasemete vahel juhuvaliku alusel (kasutades statistilisi randomiseerimistabeleid). Laadimisnorm (vt mõisted, 1. liide) peaks olema piisavalt madal, et kambrites oleks ilma otsese aereerimiseta võimalik hoida lahustunud hapniku kontsentratsiooni vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadavast väärtusest. Läbivooluga katsetes soovitatakse laadimisnormi, mis ei ületa 0,5 g/l 24 tunni kohta ega 5 g/l lahust mis tahes ajal. Hiljemalt 28 päeva pärast viljastamist tuleks kalade arv paralleelkatsetes ümber jaotada, nii et igas proovis oleks võimalikult ühesugune arv kalu. Kui kokkupuude kemikaaliga põhjustab suremust, tuleks paralleelkatsete arvu vähendada nii, et kalade asustustihedus eri kontsentratsioonidel hoitaks võimalikult ühesugune.

Valgus ja temperatuur

28. Valgustuse kestus ja veetemperatuur peaksid olema katseliigile sobivad (vt kalade sugulise arengu katses kasutatavad katsetingimused, 2. liide).

Söötmine

29. Sööt ja söötmine on otsustava tähtsusega ning on oluline, et igal arenguetapil antaks õiget sööta õigete ajavahemike tagant ja normaalse kasvu jaoks vajalikul tasemel. Söötmine peaks olema *ad libitum*, kuid ülejääk tuleks viia miinimumini. Piisava kasvukiiruse saavutamiseks tuleks kalu sööta vähemalt kaks korda päevas (nädalavahetusel on lubatav üks kord päevas); söötmiste vaheaeg peaks olema vähemalt kolm tundi. Sööda ülejäägid ja väljaheited tuleks vajaduse korral eemaldada, et vältida jäätmete kogunemist. Vastavalt kogemuste omandamisele täiustatakse pidevalt söötmisrežiimi, et vähendada suremust ja optimeerida kasvu. Kavandatav režiim tuleks lasta kinnitada tunnustatud eksperdil. Enne katse lõpetamist ei tohiks kalu 24 tundi sööta. Sobiva sööda näited on loetletud 2. liites (vt ka kaladega tehtavate katsete OECD raamistik (39)).

Uuritava kemikaali kontsentratsioonid

30. Uuritava kemikaali kontsentratsioonid tuleks valida nii, nagu on kirjeldatud 4. liites. Tuleks kasutada vähemalt kolme kontsentratsiooni vähemalt nelja paralleelkatsega. Uuritavate kontsentratsioonide vahemiku valikul tuleks arvesse võtta ägeda mürgisuse uuringus leitud LC_{50} ja kokkupuuteperioodi vahelist sõltuvust. Riskide hindamiseks sobivate andmete saamiseks on soovitatav kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni.

31. Kemikaali kontsentratsioone, mis on suuremad kui 10 % täiskasvanud isendi jaoks ägeda mürgistuse LC_{50} või 10 mg/l, milline neist on madalam, ei ole vaja uurida. Suurim katses kasutatav kontsentratsioon peaks olema 10 % LC_{50}-st vastse- või noorjärgustaadiumi jaoks.

▼M6

Kontrollkatsed

32. Lisaks uuritava aine kontsentratsioonidele tuleks teha üks lahjendusvee kontrollkatse (≥ 4 paralleelkatset) ja, kui see on asjakohane, lahusti kontrollkatse (≥ 4 paralleelkatset). Katses tuleks kasutada üksnes lahustit, mida on uuritud ja mille kohta on näidatud, et sellel ei ole statistiliselt olulist mõju katses määratavatele näitajatele.

33. Kui kasutatakse lahustit, ei tohiks selle lõplik kontsentratsioon olla suurem kui 0,1 ml/l (36) ja see peaks olema ühesugune kõikides katsekambrites, välja arvatud lahjendusvee kontrollkatse. Siiski tuleks teha kõik, et vältida sellise lahusti kasutamist või hoida selle kontsentratsioon võimalikult madal.

Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus

34. Enne katse alustamist tuleks teha uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramine, et kontrollida kõigi katse vastuvõetavuse kriteeriumide täitmist. Iga paralleelkatset tuleks eraldi analüüsida katse alguses ja lõpus. Iga uuritava kontsentratsiooni üht paralleelkatset tuleks katse ajal analüüsida vähemalt kord nädalas, vahetades süstemaatiliselt uuritavat paralleelkatset (1,2,3,4,1,2 …). Kui proove säilitatakse hilisemaks analüüsiks, peaks proovide säilitamise meetod olema eelnevalt valideeritud. Selleks, et olla kindel, et analüüsitakse uuritava kemikaali tõelist lahust, tuleks proovid filtrida (nt läbi filtri, mille poori suurus on 0,45 μm) või tsentrifuugida.

35. Katse ajal mõõdetakse kõikides katsekambrites lahustunud hapnikku, pH-d, üldkaredust, elektrijuhtivust, soolsust (kui see on asjakohane) ja temperatuuri. Iga nädal tuleks määrata vähemalt lahustunud hapniku kontsentratsiooni, soolsust (kui see on oluline) ja temperatuuri ning katse alguses ja lõpus tuleks mõõta pH-d, elektrijuhtivust ja karedust. Temperatuuri tuleks eelistatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katsekambris.

36. Tulemused peaksid põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % kontsentratsiooni nimiväärtusest kogu katse jooksul, võivad tulemused põhineda nimiväärtustel või mõõdetud väärtustel.

Vaatlused ja mõõtmised

Embrüonaalse arengu staadium

37. Kokkupuudet tuleks alustada võimalikult kohe pärast viljastamist ning enne looteketta jagunemist ja hiljemalt 12 tundi pärast viljastumist, et tagada kokkupuude varase embrüonaalse arengu jooksul.

Koorumine ja ellujäämine

38. Koorumise ja ellujäämise vaatlust tuleks teha vähemalt kord päevas ja vastavad arvud tuleks protokollida. Surnud embrüod, vastsed ja noorkalad tuleks eemaldada kohe, kui neid märgatakse, kuna need võivad kiiresti laguneda ning teised kalad võivad need tükkideks lõhkuda. Surnud isendite eemaldamisel tuleks olla eriti hoolikas, et mitte häirida või füüsiliselt kahjustada kõrvalolevaid marjaterasid/vastseid, kuna need on äärmiselt õrnad ja tundlikud. Surma kriteeriumid sõltuvad eluetapist:

— marjaterade puhul: eriti varastes etappides, oluline läbipaistvuse kadumine ja värvuse muutus, mis on põhjustatud valkainete koagulatsioonist ja/või sadestumisest, mille tulemusel välimus muutub valgeks ja läbipaistmatuks;

▼M6

— vastsete ja noorkalade puhul: liikumatus ja/või hingamisliigutuste puudumine ja/või südamelöökide puudumine ja/või kesknärvisüsteemi värvumine valgeks ja läbipaistmatuks ja/või reaktsiooni puudumine mehaanilisele ärritajale.

Kõrvalekalded välimuses

39. Tuleks registreerida selliste vastsete või kalade arv, kelle kehal esineb nähtavaid kõrvalekaldeid normist, ning kirjeldada kõrvalekalde välist pilti ja laadi. Tuleks märkida, et loomuliku arengu käigus esineb embrüote ja vastsete kõrvalekaldeid ning nende osakaal võib teatud liikidel olla kontrollkatse(te)s mitmeid protsente. Kõrvalekaldega loom tuleb katsekambrist alles siis eemaldada, kui ta sureb. Vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiivile 2010/63/EL (teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta) tuleb sellised loomad, kellele kõrvalekalded tekitavad valu, kannatusi, stressi või püsivaid kahjustusi ja usaldusväärselt on võimalik prognoosida surmlõpet, siiski uimastada ja valutult surmata, nagu on kirjeldatud punktis 44, ning võtta neid arvesse suremuse andmete analüüsil.

Kõrvalekalded käitumises

40. Kui märgatakse kõrvalekaldeid käitumises, nt hingeldamist, rikutud koordinatsiooni ujumisel, ebatüüpilist loidust ja ebatüüpilist toitumiskäitumist, tuleb see registreerida protokollis.

Kehamass

41. Katse lõpus tuleks kõik ellujäänud kalad surmata (tuimastada, kui tuleks võtta vereproovid) ja määrata iga kala märgmass (pärast kala kuivaks pühkimist).

Pikkus

42. Katse lõpus tuleks mõõta iga kala pikkus (standardpikkus).

43. Nendest vaatlustest saadakse järgmised andmed, mis esitatakse katseprotokollis:

— kumulatiivne suremus;

— tervete kalade arv katse lõpus;

— aeg koorumise alguse ja lõpuni;

— ellujäänud loomade pikkus ja mass;

— deformeerunud vastsete arv;

— ebatavalise käitumisega kalade arv.

Proovide võtmine kaladest

44. Proovid võetakse kaladest katse lõpus. Prooviks võetud kalad surmatakse valutult näiteks MS-222 abil (100–500 mg/l, puhverdatud $NaHCO_3$ abil, mida lisatakse 200 mg/l) või FA-100 abil (4-allüül-2-metoksüfenool ehk eugenool) ning mõõdetakse eraldi ja kaalutakse märjalt (kuivaks pühituna) või kui neist tuleks võtta vereproov, siis tuimastatakse (vt punkt 49).

Proovide võtmine vitellogeniini määramiseks ja soo määramiseks histoloogilise hindamisega

45. Kõik kalad tuleb võtta prooviks ja valmistada need ette soo ja vitellogeniini määramiseks. Kõiki kalu tuleks analüüsida histoloogiliselt soo määramiseks.

▼**M6**

Vitellogeniini mõõtmiseks võib igast paralleelkatsest võtta osaproovina vähemalt 16 kala. Kui osaproovi tulemus on ebaselge, tuleks vitellogeniini suhtes analüüsida rohkem kalu.

46. Vitellogeniini ja soo määramiseks proovide võtmise kord oleneb vitellogeniini määramise meetodist:

Pea/saba homogenaadi meetod vitellogeniini määramiseks

47. Kala surmatakse valutult. Iga kala pea ja saba eraldatakse skalpellilõigetega kala kehast; lõiked tehakse otse rinnauime ja otse seljauime tagant (vt joonis 1). Iga kala pea- ja sabaosad ühendatakse, kaalutakse, nummerdatakse eraldi, külmutatakse vedelas lämmastikus ja säilitatakse – 70° juures või madalamal temperatuuril vitellogeniini määramiseks. Iga kala kehaosa nummerdatakse ja fikseeritakse sobiva fikseeriva lahusega histoloogiliseks hindamiseks (22). Selle meetodi kasutamisel hinnatakse vitellogeniin ja histopatoloogia iga üksiku kala puhul eraldi ja vitellogeniini sisalduse võimaliku muutuse võib siduda kala fenotüübikohase või geneetilise sooga (jaapani riisikala ja ogalik). Täiendava teabe saamiseks vt homogeenimise juhised (5. liide) ja vitellogeniini kvantitatiivse määramise juhend (6. liide).

Maksa homogenaadi meetod vitellogeniini määramiseks

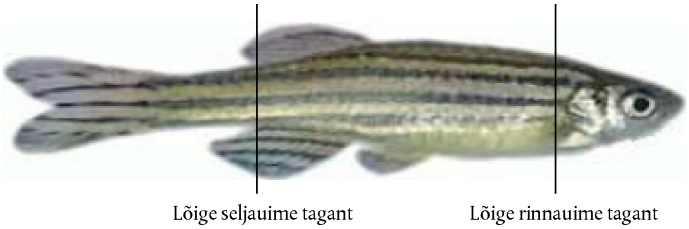
48. Kala surmatakse valutult. Maks lõigatakse välja ja säilitatakse – 70 °C juures või madalamal temperatuuril. Maksa eemaldamiseks ja eeltöötluseks soovitatud meetodid on esitatud OECD katsejuhendis nr 229 (37) või käesoleva lisa peatükis C.37 (38). Iga kala maks seejärel homogeenitakse eraldi, nagu on kirjeldatud OECD katsejuhendis nr 229 ja käesoleva lisa peatükis C.37. Supernatant kogutakse vitellogeniini mõõtmiseks homoloogse ELISA meetodiga (vt vitellogeniini kvantitatiivne mõõtmine vööt-daanio puhul, 6. liide, või jaapani riisikala puhul, OECD katsejuhend nr 229 (37)). Sellise lähenemisviisi kasutamisel saab iga kala jaoks määrata vitellogeniini ja sugunäärmete histoloogia.

Vereplasma meetod vitellogeniini määramiseks

49. Veri, mis on kogutud tuimastatud kalast südamepunktsiooniga, sabaveenist või sabalõike abil, tsentrifuugitakse 4 C juures plasma kogumiseks. Plasma säilitatakse – 70 C või madalama temperatuuri juures kuni kasutamiseni. Terve kala surmatakse valutult ja fikseeritakse histoloogia uurimiseks. Nii plasmaproovid kui ka kalad nummerdatakse ükshaaval, et vitellogeniini sisalduse saaks siduda kala sooga.

Joonis 1.

Kala lõikamine vitellogeniini mõõtmiseks pea/saba homogenaadist ja keskmise osa histoloogiliseks hindamiseks.



▼M6

Geneetilise soo määramine

50. Bioloogiline proov geneetilise soo määramiseks võetakse üksikkaladelt, kes kuuluvad liikidesse, mille isenditel on soomarkerid. Jaapani riisikala puhul võetakse pärakuuim või seljauim. 9. liites on esitatud üksikasjalik kirjeldus, sealhulgas koeproovide võtmise ja PCR-meetodiga soo määramise kohta. 10. liites on esitatud koeproovide võtmise ja PCR-meetodiga soo määramise kirjeldus ogaliku puhul.

Vitellogeniini määramine

51. Vitellogeniin tuleks määrata kvantitatiivse ja analüütiliselt valideeritud meetodiga. Laboris kasutatava meetodi puhul peaks olema teada selle tulemuste katsetevaheline ja laboritevaheline varieeruvus. Laborisiseste ja laboritevaheliste varieeruvuse põhjuseks on (kõige tõenäolisemalt) kalapopulatsioonide erinev arenguaste. Võttes arvesse vitellogeniini määramise varieeruvust, tuleb üksnes selle alusel leitud täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) väärtusesse suhtuda suure ettevaatusega. Vitellogeniini sünteesi hindamiseks käesolevas katses kasutatud kalaliikide puhul on mitmesuguseid meetodeid. Küllaltki tundlik ja spetsiifiline meetod on selle valgu kontsentratsioonide mõõtmine ensüümimmuunsorptsioonanalüüsiga (ELISA). Tuleks kasutada sama liigi vitellogeniini suhtes saadud (homoloogseid) antikehasid ja kõige olulisemaid homoloogseid standardeid.

Soo määramine

52. Sõltuvalt vitellogeniini määramiseks proovi võtmise meetodist pannakse kas terve kala või iga kala allesjäänud keskmine osa eelnevalt märgistatud töötlemiskassetti ja fikseeritakse fikseeriva lahusega, mis sobib kala soo histoloogiliseks määramiseks (ja soovi korral ka sugunäärmete arengustaadiumi hindamiseks). Fikseerimise ja parafiini sisse valamise juhendid on esitatud 7. liites ja OECD juhenddokumendis „Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads” (Juhenddokument kalade endokriinsüsteemiga seotud sugunäärmete histopatoloogia diagnoosimiseks) (22). Pärast töötlemist valatakse kalad parafiinplokkidesse. Üksikud kalad tuleks parafiinplokki paigutada pikisuunas. Igast kalast tehakse vähemalt kuus pikisuunalist frontaaltasandi lõiget (paksusega 3–5 μm), milles on näha mõlema sugunäärme koed. Nende lõigete vahekaugus peaks olema ligikaudu 50 μm isas- ja 250 μm emasloomade puhul. Kuna aga igas parafiinplokis on sageli nii isas- kui ka emasloomi (kui plokis on rohkem kui üks kala), peaks plokkidest tehtavate lõigete vahekaugus olema ligikaudu 50 μm, kuni iga isase sugunäärmetest on saadud vähemalt kuus lõiget. Seejärel võib suurendada lõigete vahekauguse kuni ligikaudu 250 μm-ni emaskalade puhul. Lõiked värvitakse hematoksüliini ja eosiini abil, ning uuritakse valgusmikroskoobiga soo määramiseks (isane, emane, vahesugu või diferentseerumata). Vahesugu on määratletud rohkem kui ühe munaraku leidumisega niisas kuue analüüsitud lõike kohta või spermatogeneesirakkude leidumisega (jah/ei) munasarjades. Munasarjade ja munandite histopatoloogia ja arengustaadiumi määramine on vabatahtlik, kuid kui seda tehakse, tuleks andmeid statistiliselt analüüsida ja need esitada. Tuleks märkida, et mõnel kalaliigil (nt jaapani riisikalal ja mõnikord võõtdaaniol) ei ole looduslikult täielikult väljaarenenud sugunäärmete paari, ja siis võib kalal olla ainult üks sugunääre. Kõik niisugused tähelepanekud tuleks registreerida.

53. Geneetilise soo määramine üksikul jaapani riisikalal põhineb isast määrava geeni DMY olemasolu või puudumise määramisel; DMY asub Y-kromosoomis. Riisikala genotüübilise soo võib teha kindlaks näiteks päraku- või seljauimetüki DNA-st eraldatud DMY-geeni sekveneerimisega.

▼M6

DMY
olemasolu näitab, et tegemist on XY-kromosoomipaariga (isaskala), olenemata kala fenotüübist, samas kui DMY puudumine osutab XX-paarile (emaskala), olenemata fenotüübist (23). Koepreparaatide valmistamise ja PCR-meetodi kasutamise juhendid on esitatud 9. liites. Ka üksiku ogaliku geneetiline sugu määratakse PCR-meetodiga, mida on kirjeldatud 10. liites.

54. Vahesoo (vt mõisted, 1. liide) esinemine tuleks märkida katseprotokollis.

Teisesed sootunnused

55. Sellistel liikidel nagu jaapani riisikala on teisesed sootunnused endokriinsüsteemi kontrolli all; seepärast tuleks kemikaaliga kokkupuute lõpus teha võimaluse korral kala füüsilise välimuse vaatlus. Jaapani riisikala puhul on nn papillaari moodustumine pärakuuime tagaosas emaskaladel androgeenisõltuv. Käesoleva lisa peatükis C.37 (38) on esitatud asjakohased fotod isaskalade ja androgeeniga mõjutatud emaskalade teiseste sootunnuste kohta.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

56. On oluline, et uuritav näitaja määrataks kõige usaldusväärsema statistilise testiga. Eksperimentaalne ühik on paralleelkatse, kuid paralleelkatsete vaheline hajuvus peaks olema statistilises analüüsis arvesse võetud. 8. liites on esitatud otsustamisskeem; see peaks aitama kasutada kõige kohasemat statistilist testi, millega võetaks arvesse katsega saadud andmete omadusi. Statistilise olulisuse tase on 0,05 kõigi määratavate näitajate puhul.

Sooline jaotumine ja geneetiline sugu

57. Soolises jaotumises tuleks analüüsiga otsida olulist mõju (NOEC/LOEC lähenemisviis), mida on avaldanud kokkupuude kemikaaliga; kui doosi-toime sõltuvus on monotoonne, siis sobib Jonckheere'i-Terpstra (trendi-)test. Mittemonotoonse mõju puhul tuleb rakendada paariviisi võrdlemist: kui saadakse normaaljaotus ja homogeenne dispersioon, tuleb kasutada Dunnetti testi. Heterogeense dispersiooni puhul kasutatakse Tamhane-Dunnetti testi. Muudel juhtudel kasutatakse Mann-Whitney täpset testi koos Bonferroni-Holmi kohandusega. 8. liites on esitatud soolise jaotumise andmete statistilise töötlemise otsustamisskeem. Soolise jaotumise andmed tuleks esitada tabelis: isaste, emaste, vahesoo ja diferentseerumata suguelunditega isendite osakaal igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ± standardhälve. Esile tuleks tõsta statistiline olulisus. Kalade sugulise arengu katse valideerimise 2. etapi aruandes (42) on esitatud sellekohased näited. Geneetiline sugu tuleks esitada protsendina fenotüübi poolest isaste, emaste, vahesoost või sootunnuste osas diferentseerumata kalade hulgas.

Vitellogeniini kontsentratsioonid

58. Vitellogeniini kontsentratsioonis tuleks analüüsiga otsida olulist mõju (NOEC/-LOEC lähenemisviis), mida on avaldanud kokkupuude kemikaaliga. Parem on kasutada Dunnetti testi kui t-testi koos Bonferroni parandusega. Kui kasutatakse Bonferroni parandust, siis on eelistatav Bonferroni-Holmi parandus. Vitellogeniini kontsentratsiooni tuleks vaadelda logaritmilisel kujul, et saavutada normaaljaotus ja dispersiooni homogeensus. Seejärel, kui kontsentratsiooni-toime sõltuvus on monotoonne, tuleks kõikidest eespool kirjeldatutest eelistada Jonckheere'i-Terpstra testi. Kui kasutatakse t-teste või Dunnetti testi, ei ole jätkamiseks vaja ANOVA

▼M6

olulisuse F-testi. Üksikasjad on esitatud 8. liites otsustusskeemis. Tulemused tuleks esitada tabelis: isaskalade, emaskalade, vahesoost kalade ja diferentseerumata suguelunditega kalade puhul mõõdetud keskmine kontsentratsioon ± standardhälve. Esile tuleks tuua statistiline olulisus fenotüübiliste emaste ja fenotüübiliste isaste puhul. Kalade sugulise arengu katse valideerimise 2. etapi aruandes (42) on esitatud sellekohased näited.

Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid

59. Uuritava kemikaali tegelikke kontsentratsioone katsekambrites tuleks analüüsida sellise sagedusega, nagu on öeldud punktis 34. Tulemused tuleks esitada tabelites: keskmine kontsentratsioon ± standardhälve paralleelkatsete põhjal, samuti kontsentratsiooni põhjal; lisada teave proovide arvu kohta ja tõsta esile suured, ± 20 % kõrvalekalded keskmisest uuritava kemikaali kontsentratsioonist. Kalade sugulise arengu katse valideerimise 2. etapi aruandest (42) võib leida sellekohased näited.

Tulemuste tõlgendamine

60. Katse tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, kui uuritavates lahustes mõõdetud uuritava kemikaali kontsentratsioonid on analüütilise meetodi määramispiiri lähedal.

Katseprotokoll

61. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav kemikaal

— asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kemikaali identifitseerimisandmed, sh andmed uuritava kemikaali puhtuse kohta ja kvantitatiivse sisalduse mõõtmiseks kasutatud analüütilise meetodi kohta.

Katsetingimused

— Kasutatud katsemeetod (läbivoolukatse või poolstaatiline uuendamisega katse); katse kava, sealhulgas uuritava kemikaali kontsentratsioonid, põhilahuse valmistamise meetod (lisas), uuendamise sagedus (kui kasutatakse lahustit, siis selle nimetus ja kontsentratsioon);

— uuritava kemikaali nominaalsed kontsentratsioonid, katsekambrites mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed ning nende mõõtmismeetod (kasutatud analüüsimeetod tuleb esitada lisas); tõendid selle kohta, et mõõdeti uuritava kemikaali kontsentratsiooni tegelikus lahuses;

— vee kvaliteet katsekambrites: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;

— üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda (söötade) tüüp, päritolu, antud kogus ja söötmise sagedus ning saasteainete analüüs (nt polüklorobifenüülid, polüaromaatsed süsivesinikud ja kloororgaanilised pestitsiidid), kui see on asjakohane.

Tulemused

— Tõendid selle kohta, et kontrollkatsed vastasid nõuetekohasuse kriteeriumidele: koorumismäära käsitlevad andmed tuleks esitada tabelites protsendina iga paralleelkatse ja uuritava kontsentratsiooni kohta. Võõrväärtused, mis ei vasta heakskiitmise kriteeriumidele (kontrollides), tuleks esile tõsta. Ellujäämismäär tuleks esitada tabelites protsendina iga paralleelkatse ja uuritava kontsentratsiooni kohta. Võõrväärtused, mis ei vasta katse nõuetekohasuse kriteeriumidele (kontrollides), tuleks esile tõsta.

— Selgelt tuleb esitada otsitavate näitajate jaoks saadud tulemused: embrüote ellujäämine ja koorumise õnnestumine; välised anomaaliad; pikkus ja mass; vitellogeniini mõõtmised (ng homogenaadi g kohta, ng plasma kohta või ng maksa mg kohta); sugunäärmete histoloogia,

▼M6

sooline jaotumine, geneetilise soo andmed; kalade ebatavalised reaktsioonid ja nähtavad muutused, mida on põhjustanud uuritav kemikaal.

62. Tulemused tuleks esitada kujul: keskväärtus ± standardhälve (SD) või standardviga (SE). Statistika tuleks käsitleda vähemalt LOEC ja NOEC väärtuste ja usaldusvahemike esitamise juures. Järgida tuleks statistiliste töötluste skeemi (8. liide).

KIRJANDUS

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194-202.

(3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", Environmental Health Perspectives 103, pp. 173-178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), „An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119-131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters", Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319-321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", Aquatic Toxicology 65, pp. 397-411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319-326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), „Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113-125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)", Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699-1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161-169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney

▼**M6**

hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", Aquatic Toxicology 70, pp. 311-326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", Journal of Health Science 50, pp. 301-308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. Aquatic Toxicology", 78, pp. 202-206.

(16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621-633.

(19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone", Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237-243.

(20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development" 3, pp. 136-151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*", Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088-1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*", Developmental Dynamics 231, pp. 518-526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations", Zoological Science 21, pp. 613-619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake", Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920-1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", Aquatic Toxicology 77, pp. 279-290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57-66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)", Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257-266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", Aquatic Toxicology 98, pp. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", Aquatic Toxicology 63, pp. 391-403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development", Aquatic Toxicology 70, pp. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165-170.

(34) Käesoleva lisa peatükk C.14. Noorkalade kasvukatse.

(35) Käesoleva lisa peatükk C.4. Kohese biolagunduvuse määramine.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(38) Käesoleva lisa peatükk C.37. 21-päevane katse kaladega – lühiajaline sõelkatse östrogeense ja androgeense toime ning aromataasi inhibeerimise kontrollimiseks.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*" Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 pp 768-779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/-MONO(2011)22, OECD, Paris.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/-MONO(2011)23, OECD, Paris.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/-MONO(2011)24, OECD, Paris.

(44) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta. ELT L 276, 20.10.2010, lk 33.

▼M6

1. liide

Lühendid ja mõisted

Apikaalne näitaja – näitaja, mis iseloomustab mõju populatsiooni tasandil

ASV – õhuga küllastamise väärtus (*air saturation value*)

Biomarker – näitaja, mis iseloomustab mõju üksikisendi tasandil

Kemikaal – aine või segu

DPH – päevad pärast koorumist (*Days post hatch*)

DMY – Y-spetsiifiline DM-domeeni geen, mis määrab jaapani riisikala arenemise isaskalaks

ELISA – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Kala mass – kuivaks pühitud kala märgmass

FSDT – kalade seksuaalse arengu katse

HAS-telg – hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg

Vahesoost kala – kala, kellel on enam kui üks munarakk niisas kuue analüüsitud lõike kohta või spermatogeneesi rakud munasarjades (jah/ei)

Laadimisnorm – kalade märgmass vee ruumala kohta

MOA – toimemehhanism (*mode of action*)

RT-PCR – pöördtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsioon

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil

Diferentseerumata kala – kala, kelle sugunäärmetes ei ole võimalik eristada sugurakke.

VTG – vitellogeniin

▼**M6**

2. liide

Kalade sugulise arengu katse tingimused (mageveekalade liigid)

1. Soovitatav liik	Jaapani riisikala (*Oryzias latipes*)	Võõtdaanio (*Danio rerio*)	Harilik ogalik (*Gasterosteus aculeatus*)
2. Analüüsi tüüp	Läbivooluga või poolstaatiline	Läbivooluga või poolstaatiline	Läbivooluga või poolstaatiline
3. Vee temperatuur	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)
5. Valguse intensiivsus	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 080 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 080 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 080 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)
6. Valgustusperiood	12–16 tundi valgust, 8–12 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 8–12 tundi pimedust	16 tundi valgust, 8 tundi pimedust
7. Minimaalne kambri suurus	Iga üksikkamber peaks sisaldama vähemalt 7 l vett	Iga üksikkamber peaks sisaldama vähemalt 7 l vett	Iga üksikkamber peaks sisaldama vähemalt 7 l vett
8. Uuritava lahuse kogu ruumala asendamine	Vähemalt 5 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas
9. Katseorganismide vanus kemikaaliga kokkupuute alguses	Värskelt viljastatud marjaterad (varane blastula staadium)	Värskelt viljastatud marjaterad (varane blastula staadium)	Värskelt viljastatud marjaterad
10. Marjaterade arv ühe kemikaalikontsentratsiooni kohta	Vähemalt 120	Vähemalt 120	Vähemalt 120
11. Kontsentratsioonide arv	Vähemalt 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)	Vähemalt 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)	Vähemalt 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)
12. Paralleelkatsete arv ühe kemikaalikontsentratsiooni kohta	Vähemalt 4 (välja arvatud ruutjuurjaotustega kontrollkatsete puhul)	Vähemalt 4 (välja arvatud ruutjuurjaotustega kontrollkatsete puhul)	Vähemalt 4 (välja arvatud ruutjuurjaotustega kontrollkatsete puhul)
13. Söötmisrežiim	Elus *Artemia*, külmutatud täiskasvanud soolase vee hall krevett, helvessööt jne. Soovitatakse sööta kaks korda päevas.	Spetsiaalne kalamaimude kuivtoit, elus *Artemia*, külmutatud täiskasvanud soolase vee hall krevett, helvessööt jne. Soovitatakse sööta kaks korda päevas.	Elus *Artemia*, külmutatud täiskasvanud soolase vee hall krevett, helvessööt jne. Soovitatakse sööta kaks korda päevas.
14. Õhustus	Ei ole vajalik, välja arvatud juhul, kui lahustunud hapniku sisaldus langeb alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Ei ole vajalik, välja arvatud juhul, kui lahustunud hapniku sisaldus langeb alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Ei ole vajalik, välja arvatud juhul, kui lahustunud hapniku sisaldus langeb alla 70 % küllastuskontsentratsioonist

▼**M6**

15. Lahjendusvesi	Puhas pinna-, kaevu- või taastatud vesi	Puhas pinna-, kaevu- või taastatud vesi	Puhas pinna-, kaevu- või taastatud vesi
16. Uuritava kemikaaliga kokkupuute kestus	60 päeva pärast koorumist	60 päeva pärast koorumist	60 päeva pärast koorumist
17. Bioloogilised näitajad	Koorumise edukus, ellujäämine, üldine morfoloogia, vitellogeniinsugunäärmete histoloogia, geneetiline sugu sooline jaotumine	Koorumise edukus, ellujäämine üldine morfoloogia, vitellogeniin sugunäärmete histoloogia, sooline jaotumine Koorumise edukus, ellujäämine	üldine morfoloogia, vitellogeniin sugunäärmete histoloogia, sooline jaotumine
18. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid kontrollrühmade koondatud paralleelkatsete puhul	Koorumise edukus > 80 %	Koorumise edukus > 80 %	Koorumise edukus > 80 %
	Ellujäämine pärast koorumist ≥ 70 %	Ellujäämine pärast koorumist ≥ 70 %	Ellujäämine pärast koorumist ≥ 70 %
	Kasv (kuivaks pühitud kala märgmass) > 150 mg	Kasv (kuivaks pühitud kala märgmass) > 75 mg	Kasv (kuivaks pühitud kala märgmass) > 120 mg
	Pikkus (standardpikkus) > 20 mm	Pikkus (standardpikkus > 14 mm)	Pikkus (standardpikkus) > 20 mm
	Sooline jaotumine (isasloomade või emasloomade %) 30 % – 70 %	Sooline jaotumine (isasloomade või emasloomade %) 30 % – 70 %	Sooline jaotumine (isasloomade või emasloomade %) 30 % – 70 %

▼**M6**

3. liide

Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused

KOOSTISOSA	KONTSENTRATSIOON
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

▼**M6**

4. liide

Tabel katsemeetodist c.14: juhend uuritavate kontsentratsioonide valimiseks

Veerg (kontsentratsioonide arv 100 ja 10 või 10 ja 1 vahel) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Veerust võib valida kolmest (või enamast) järjestikusest kontsentratsioonist koosneva jada. Kontsentratsioonidevahelised keskpunktid veerus (x) leitakse veerus (2x + 1). Loetletud väärtused võivad esindada kontsentratsioone, mida väljendatakse protsendina mahu või massi kohta (mg/l või µg/l). Väärtusi võib vajaduse korral korrutada või jagada 10 mis tahes astmega. 1. veergu võiks kasutada juhul, kui määramatus mürgisuse taseme kohta on suur.

▼M6

5. liide

Juhend noore vöötdaanio, tüseda tõmpnina, hariliku ogaliku ja jaapani riisikala pea/saba homogenaadi valmistamiseks

Käesoleva osa eesmärk on kirjeldada vitellogeniini kontsentratsiooni määramise ettevalmistavaid etappe. Vitellogeniini kontsentratsiooni määramiseks võib kasutada ka muid meetodeid, mis annavad sellega võrreldavaid tulemusi. Vitellogeniini kontsentratsiooni võib pea/saba homogenaadi asemel määrata ka vereplasmast või maksast.

Töö käik

1. Kalad tuimastatakse ja surmatakse humaansel viisil kooskõlas katse kirjeldusega.

2. Kala pea ja saba lõigatakse ära kooskõlas katse kooskõlas. **Oluline märkus:** kõik lõikeriistad ja lõikelaud tuleks loputada ja korralikult puhastada (näiteks 96 % etanooliga) enne iga üksiku kala lõikamist, et hoida ära indutseerimata isaskalade saastamist emaskalade ja indutseeritud isaskalade vitellogeniiniga.

3. Iga kala pea ja saba summaarne mass mõõdetakse milligrammi täpsusega.

4. Pärast kaalumist pannakse need kehaosad sobivasse nõusse (nt 1,5 ml Eppendorfi katsuti) ja külmutatakse – 80 °C juures kuni homogeenimiseni või homogeenitakse kohe jää peal kahe plastikvarda abil. (Võib kasutada ka muid meetodeid, kui homogeenimine toimub jää peal ja saadakse homogeenne mass.) **Oluline märkus:** *Viaalid peavad olema korralikult nummerdatud, nii et kala pea ja saba on kokkuviidavad vastava kehatükiga, mida kasutatakse sugunäärmete histoloogia uurimiseks.*

5. Pärast ühtlase massi saavutamist lisatakse koemassiga võrreldes 4–10-kordne kogus jääkülma **homogeenimispuhvrit** (*) (märkige üles lahjendusaste). Töötage varrastega edasi, kuni segu on homogeenne. **Oluline märkus:** *Iga kala puhul kasutatakse uusi vardaid.*

6. Proovid pannakse jääle kuni tsentrifuugimiseni 4 °C ja 50 000 g juures 30 minuti jooksul.

7. Pipetiga võetakse 20–50 µl (märkige üles kogus) supernatanti ja pannakse vähemalt kahte viaali; pipeti ots viiakse pinnal olevat rasvakihi alla ja tõmmatakse supernatanti sisse nii, et rasva- ja põhjas oleva sademe fraktsioon kaasa ei tuleks.

8. Viaale säilitatakse temperatuuril – 80 °C kuni kasutamiseni.

(*) *Homogeenimispuhver:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteaasiinhibiitorite segu (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaasiinhibiitorite segu (või samaväärset proteaasiinhibiitorite segu).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Proteaasiinhibiitorite segu: Sigmalt (imetajate kudede jaoks), tootenumber **P 8340**.

Märkus. Homogeenimispuhver peaks olema valmistatud kasutamise päeval. Asetage kasutamise ajaks jääle.

▼M6

6. liide

Juhend vitellogeniini mõõtmiseks vöötdaanio (*Danio rerio*) pea/saba homogenaadist (muudetud holbech et al., 2001). võib kasutada muid meetodeid, milles kasutatakse homoloogseid antikehi ja standardeid

1. Mikrotiiterplaadid (sertifitseeritud Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Taani), mis on eelnevalt kaetud vöötdaanio lipovitelliini vastase IgG-ga kontsentratsioonis 5 µg/ml, sulatatakse ja pestakse kolm korda pesemispuhvriga (*).

2. Vöötdaanio puhastatud vitellogeniini standardit ([1]) lahjendatakse seeriana kontsentratsioonideni 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 ng 1 ml lahjenduspuhvri (**) kohta ja proove lahjendatakse vähemalt 200 korda (maatriksiefekti vältimiseks) lahjenduspuhvris ja kantakse plaatidele. Kontrollkatse tehakse kahe paralleelkatsena. Mikrotiiterplaadi igasse süvendisse kantakse 150 µl. Standardainega tehakse kaks paralleelmääramist ja proovidega kolm. Inkubeeritakse 4 °C juures üle öö loksutil.

3. Plaate pestakse 5 korda pesemispuhvriga (*).

4. Dekstraaniahelale (nt AMDEX A/S, Taani) seotud mädarõika peroksidaas ja konjugeeritud antikehad lahjendatakse pesemispuhvris; kasutatav lahjendus sõltub partiist ja vanusest. Igasse süvendisse pannakse 150 µl ja plaate inkubeeritakse loksutil 1 tund toatemperatuuril.

5. Plaate pestakse viis korda pesemispuhvriga (*) ja süvendite põhjad puhastatakse hoolikalt etanooliga.

6. Mikrotiiterplaadi igasse süvendisse kantakse 150 µl lahust TMB plus (***). Plaat varjatakse valguse eest fooliumiga ja jälgitakse värvuse ilmumist loksutil.

7. Kui standardkõver on täielikult ilmutatud, pidurdatakse ensüümi aktiivsus 150 µl 0,2 M H_2SO_4 lahuse lisamisega igasse süvendisse.

8. Neeldumine mõõdetakse lainepikkusel 450 nm (nt Molecular Devices Thermomax'i plaadilugejaga). Andmeid analüüsitakse asjakohase programmiga (nt Softmax).

(*) Pesemispuhver:

PBS-põhilahust (****)	500,0	ml
Veise seerumialbumiini BSA)	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

pH viiakse 7,3 peale ja täidetakse 5 l-ni veega, mis on lastud läbi Millipore'i filtri. Säilitatakse temperatuuril 4 °C.

(**) Lahjenduspuhver:

PBS-põhilahus (****)	100,0	ml
Veise seerumialbumiini (BSA)	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

pH viiakse 7,3 peale ja täidetakse 1 l-ni veega, mis on lastud läbi Millipore'i filtri. Säilitatakse temperatuuril 4 °C

(***) TMB plus on kasutusvalmis substraat, mida toodab KemEnTec (Taani). See on tundlik valguse suhtes. Säilitatakse temperatuuril 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), mis on puhastatud, nagu on kirjeldatud töös Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

▼**M6**

(****) PBS-põhilahust

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

pH viiakse 6,8 peale ja täidetakse 2 l-ni veega, mis on lastud läbi Millipore'i filtri. Säilitatakse toatemperatuuril.

▼M6

7. liide

Juhend koelõikude ettevalmistamiseks soo ja sugunäärmete arengustaadiumi määramiseks

Käesoleva osa eesmärk on kirjeldada koelõikude ettevalmistamist histoloogiliseks hindamiseks. Võib kasutada ka muid meetodeid, millega saadakse sarnased soolise jaotumise ja sugunäärmete arengustaadiumi näitajad.

Väheste eranditega on need meetodid samasugused jaapani riisikala ja vöötdaanio puhul.

Valutu surmamine, lahkamine ja kudede fikseerimine

Eesmärgid:

1. Tagada kalade humaanne surmamine.

2. Teha vajalikud kehamassi ja muud mõõtmised.

3. Hinnata sekundaarseid sootunnuseid.

4. Lõigata välja koed vitellogeniini määramiseks.

5. Fikseerida sugunäärmed.

Töö käik:

1. Kalad tuleks surmata vahetult enne lahkamist. Kui lahkajaid ei ole palju, siis ei tohiks korraga surmata paljusid kalu.

2. Väikse kahvaga võetakse kala katsekambrist ja viiakse transpordimahutis lahkamiskohta.

3. Kala pannakse valutu surmamise lahusesse. Kala võetakse lahusest välja, kui hingamisliigutused on lakanud ja kala ei reageeri välistele ärritajatele.

4. Kala kaalutakse märjalt.

5. Selleks, et valmistada koed ette vitellogeniini määramiseks, võib kala panna lahkamismikroskoobi korkkattega alusele.

   a. Vöötdaanio puhul lõigatakse pea maha otse rinnauime tagant ja saba lõigatakse maha otse seljauime tagant.

   b. Jaapani riisikala puhul avatakse kõht hoolika sisselõikega, mis ulatub mööda kõhu keskjoont rinnavöötmest kuni punktini, mis asub kohe päraku peapoolse otsa kõrval. Väikeste pintsettide ja väikeste kääridega eemaldatakse hoolikalt maks.

6. Proov vitellogeniini määramiseks pannakse Eppendorfi katsutisse ja külmutatakse viivitamata vedelas lämmastikus.

7. Rümp sugunäärmetega pannakse eelnevalt märgistatud plastikust koekassetti, mis paigutatakse Davidsoni või Bouini fikseerivasse lahusesse. Fikseerivat lahust peaks ruumala poolest olema vähemalt 10 korda rohkem kui on koe hinnanguline maht. Fikseeriva lahusega anumat loksutatakse ettevaatlikult viis sekundit, et kõrvaldada kassetist õhumulle.

8. a. Kõik koed jäetakse Davidsoni fikseerivasse lahusesse üheks ööks, järgmisel päeval kantakse need üle eraldi nõudesse, milles on neutraalse puhvriga 10 % formaliini lahus. Nõusid kassettidega loksutatakse ettevaatlikult 5 sekundit, et formaliin saaks vabalt tungida kassettidesse.

▼M6

b. Koed jäetakse Bouini fikseerivasse lahusesse 24 tunniks, seejärel viiakse need üle 70 % etanooli.

Kudede töötlemine

Eesmärgid:

1. Veetustada kude parafiini korraliku läbitungimise võimaldamiseks.

2. Kude immutatakse parafiiniga koe terviklikkuse säilitamiseks ja kindla pinna loomiseks, mis võimaldaks teha mikrotoomilõikeid.

Töö käik:

3. Märgistatud koekassetid võetakse formaliinist/etanoolist välja ja pannakse töötlemiskorvi(desse). Töötlemiskorv pannakse koeprotsessorisse.

4. Valitakse töötlemisrežiim.

5. Kui seade lõpetab töötlemistsükli, võib korvi(d) üle viia sisestamisseadmesse.

Sisestamine

Eesmärk:

Orienteerida proov tahkestatud parafiinis õigesti mikrotoomia jaoks.

Töö käik:

1. Korv(id) kassettidega võetakse protsessorist välja ja sukeldatakse sisestamisseadme termokonsooli parafiiniga täidetud eeskambrisse või viiakse kassetid üle eraldi parafiinikuumutisse.

2. Esimene sisestatav kassett võetakse välja termokonsooli eeskambrist või parafiinikuumutist. Kasseti kaas võetakse ära ja visatakse minema ning kassetil olevat märgistust võrreldakse looma kohta registreeritud andmetega, et lahendada võimalikud vastuolud enne sisestamist.

3. Valitakse sobiva suurusega sisestamisvorm.

4. Vormi hoitakse dosaatorkonsooli väljalaskeava all ja see täidetakse sula parafiiniga.

5. Proov võetakse kassetist ja pannakse vormi sulasse parafiini. Nii tehakse iga parafiinivormi puhul 4–8 prooviga. Iga üksiku kala asend märgitakse nii, et kala nr 1 on 180 kraadi all kala nr 2-4/8 suhtes.

6. Lisatakse parafiini proovi katmiseks.

7. Vorm kassetialusega pannakse krüokonsooli jahutusplaadile.

8. Pärast parafiini tahkestumist võetakse plokk (st tahkestunud parafiin, mis sisaldab kudesid ja kassetipõhjasid) vormist välja.

Mikrotoomia

Eesmärk:

lõigata ja seada histoloogilised koelõiked valmis värvimiseks.

Töö käik:

1. Mikrotoomia algetapil proov positsioneeritakse järgmiselt:

   a. Parafiiniplokk pannakse mikrotoomi kelgule.

   b. Kelku liigutatakse edasi mikrotoomi ratta abil ja parafiiniploki pinnalt lõigatakse pakse kihte, kuni nuga jõuab sisestatud kudedeni.

▼M6

c. Mikrotoomi lõikepaksuseks seatakse 3–5 mikronit. Kelku lükatakse edasi ja plokist tehakse mitu lõiget, et kõrvaldada kõik artefaktid, mis võivad olla tekkinud koelõigu pinnal jämeda kärpimisega.

d. Ploki võib kelgult maha võtta ja panna jääle esiküljega allapoole koe niisutamiseks.

2. Mikrotoomia järgmine etapp on lõplik lõigete tegemine ja koeliistakute panemine objektiklaasile. See toimub järgmiselt:

a. Kui plokk on pandud jääle, võetakse see sealt ära ja pannakse tagasi mikrotoomi kelgule.

b. Mikrotoomi lõigete paksuseks seatakse 3–5 mikronit, kelku liigutatakse edasi mikrotoomi ratta keeramisega. Plokist tehakse lõikeid, kuni saadakse riba, milles on vähemalt üks korralik sugunäärmeid hõlmav lõige. (Lõikamise puhul võib olla vajalik võtta plokk kelgult, panna koe niisutamiseks jääle ja panna siis tagasi kelgule.)

c. Lõiked pannakse vesivanni veepinnale lapiti ujuma. Püütakse leida vähemalt üks lõige, millel ei oleks kortse ja mille all ei oleks kinnijäänud õhumulle.

d. Mikroskoobi objektiklaas pannakse vette parima lõike alla ja tõstetakse see klaasi abil veest välja. See protsess on paigaldamine objektiklaasile.

e. Ühe kala komplekti jaoks valmistatakse kolm lõiget. Teine ja kolmas lõige tehakse pärast esimest lõiget 50 mikroniliste vahemaade järel. Kui kala ei ole sisestatud nii, et sugunäärmed oleksid ühes ja samas lõiketasapinnas, tuleb teha rohkem lõikeid; iga kala kohta tuleb saada vähemalt kuus sugunäärmeid hõlmavat lõiget.

f. Markeriga märgitakse objektiklaasile ploki number, millest saadi klaasil olev lõige.

g. Objektiklaas pannakse värvimisraamile.

h. Plokk võetakse kelgult ja pannakse hoiukohta esiküljega allapoole.

Värvimine, kaanetamine ja preparaadi märgistamine

Eesmärgid:

— Värvida lõiked histopatoloogiliseks uuringuks.

— Püsivalt sulgeda objektiklaasile paigutatud ja värvitud kude.

— Püsivalt märgistada värvitud lõiked nii, et oleks tagatud täielik jälgitavus.

Töö käik:

1. Värvimine

a. Objektiklaase kuivatatakse õhu käes enne värvimist üks öö.

b. Lõiked värvitakse hematoksüliini ja eosiiniga.

2. Kaanetamine

a. Kaaned võib peale panna käsitsi või automaadiga.

b. Objektiklaas kastetakse ksüleeni või TissueClear'i sisse ja liigne vedelik eemaldatakse klaasi ettevaatliku koputamisega.

▼**M6**

c. Objektiklaasi selle serva lähedale, mis on mati ääre vastasküljel, või kaanele kantakse ligikaudu 0,1 ml kinnituskeskkonda.

d. Kaant objektiklaasi suhtes väikse nurga all hoides pannakse kaas objektiklaasi peale.

3. Märgistamine

a. Igal objektiklaasil esitatakse järgmine teave:

i. Labori nimi

ii. Liik

iii. Proovi nr / preparaadi nr

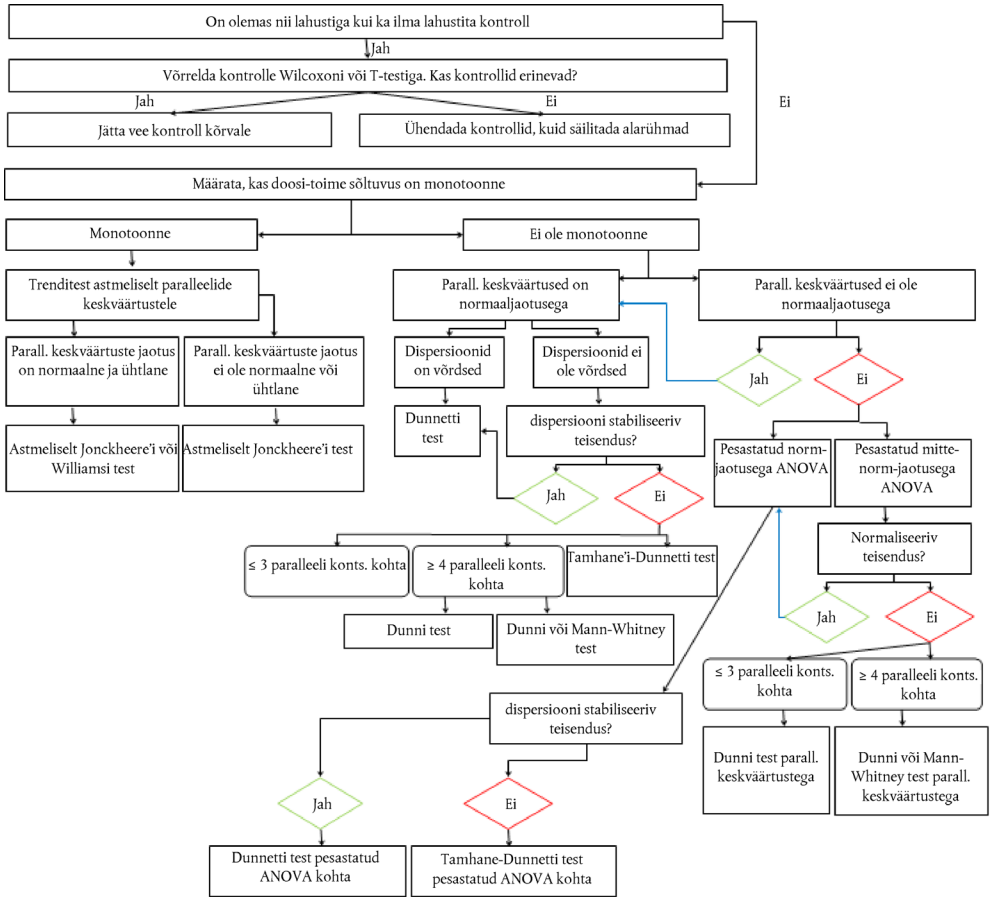
iv. Kemikaal / kontsentratsioonirühm

v. Kuupäev

▼M6

8. liide

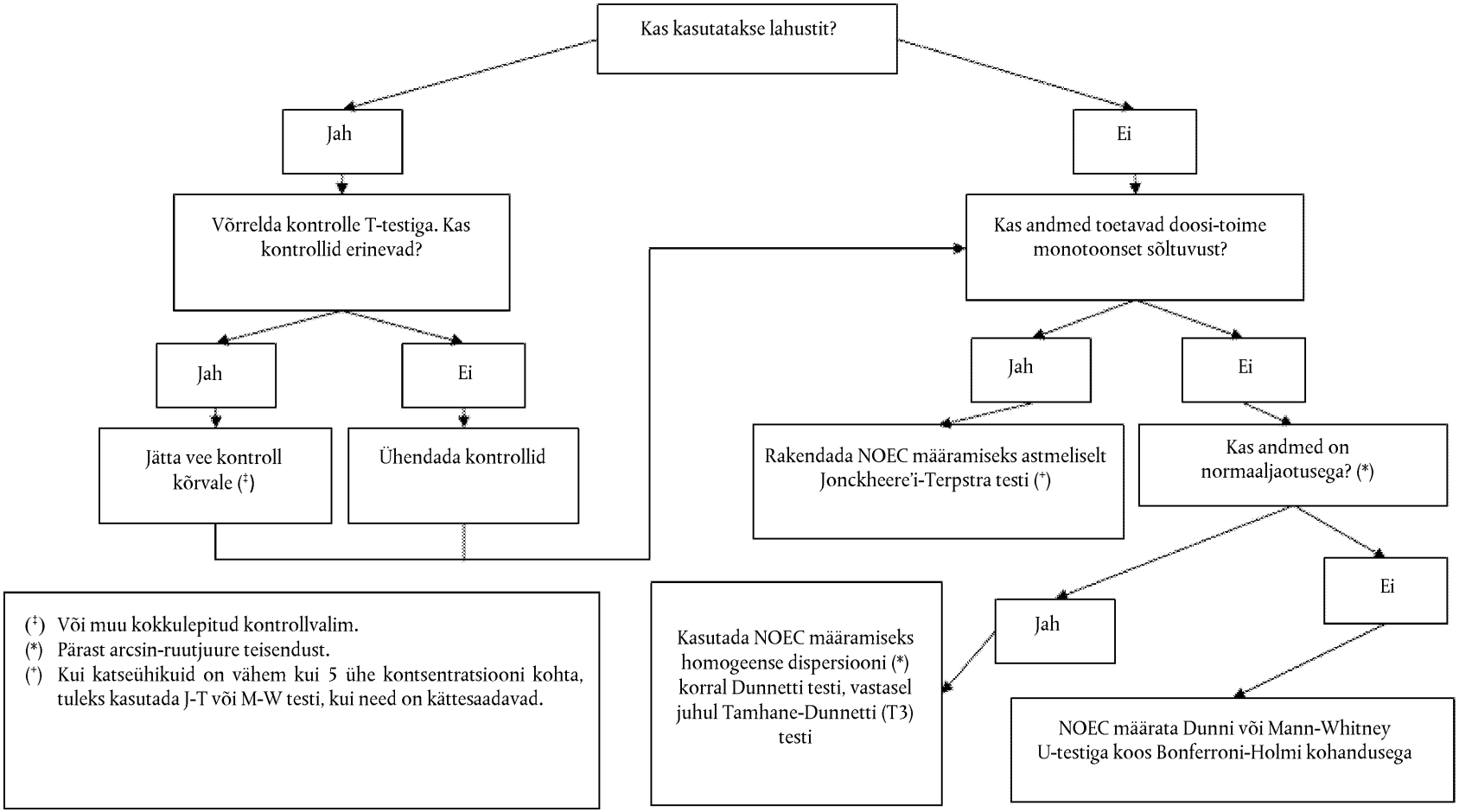
Vitellogeniini määramise tulemuste statistilise analüüsi otsustamisskeem



02008R0440 — ET — 16.10.2019 — 008.001 — 2318

▼M6

Soolise jaotumise määramise tulemuste statistilise analüüsi otsustusskeem



▼M6

9. liide

Geneetilise soo määramiseks vajalike koeproovide võtmise ja PCR-meetodiga geneetilise soo määramise juhend

Jaapani riisikala koeproovide võtmine, ettevalmistamine ja säilitamine enne geneetilise soo määramist PCR-meetodiga (koostanud Bayer CropScience AG veeorganismide labor)

1. Iga kala päraku- või seljauim lõigatakse väikeste kääridega ära ja pannakse katseklaasi, milles on 100 µl ekstraheerimispuhvrit 1 (puhvri valmistamise üksikasjad on esitatud allpool). Kääre puhastatakse pärast iga kala lõikamist destilleeritud veega täidetud keeduklaasis ja kuivatatakse pabersalvrätiga.

2. Uimekoed homogeenitakse nüüd mikrotorus teflonvarda abil rakkude lüüsi saavutamiseks. Iga toru puhul kasutatakse uut varrast, et vältida saastamist. Vardad pannakse ööseks 0,5 M NaOH sisse, loputatakse viis minutit destilleeritud vees ja hoitakse etanoolis või steriilsena pärast autoklaavimist kuni kasutamiseni.

3. Uimekudet on võimalik hoida ilma ekstraheerimispuhvrita 1 kuival jääl ja seejärel külmkapis – 80 °C juures, et vältida DNA lagunemist. Kuid ekstraheerimine läheb paremini, kui te ekstraheerite DNA kohe samal ajal (käsitsemine vt eespool; proovid tuleks sulatada jääl pärast säilitamist – 80 °C juures, enne kui puhver viiakse torudesse).

4. Pärast homogeenimist viiakse kõik torud vesivanni ja keedetakse 15 minutit 100 °C juures.

5. Seejärel lisatakse igasse torusse pipetiga 100 µl ekstraktsioonipuhvrit 2 (puhvri valmistamise üksikasjad vt allpool). Proove hoitakse toatemperatuuril 15 minutit ja selle aja jooksul neid aeg-ajalt loksutatakse käsitsi.

6. Seejärel pannakse kõik torud jälle vesivanni keedetakse veel 15 minutit 100 °C juures.

7. Kuni edasise analüüsini torud külmutatakse – 20 °C juures.

Puhvrite valmistamine

PCR-puhver 1:

500 mg N-lauroüülsarkosiini (nt Merck KGaA, Darmstadt, Saksamaa)

2 ml 5 M NaCl lahust

lisada dest. vett 100 ml-ni

→ autoklaavida

PCR-puhver 2:

20 g Chelex'it (nt Biorad, München, Saksamaa)

lasta paisuda 100 ml-s dest. vees

→ autoklaavida

Jaapani riisikala geneetilise soo määramine PCR-meetodiga (koostanud Bayer CropScience AG veeorganismide labor ja Würzburgi ülikooli biokeskus)

Ettevalmistatud ja külmutatud torud (vt eelmine jagu) sulatatakse jää peal. Pärast seda need tsentrifuugitakse Eppendorfi tsentrifuugis (30 s maksimaalse kiirusega, toatemperatuuril). PCR-analüüsi jaoks kasutatakse sademest eraldatud selget supernatanti. Tuleb kindlalt vältida sademes oleva Chelex'i vähimategi jälgede ülekandmist PCR-reaktsiooni, kuna see segab Taq-polümeraasi aktiivsust. Supernatanti kasutatakse kas kohe või seda võib säilitada külmutatult (– 20 °C juures) ja uuesti üles sulatada (ka mitu korda), ilma et see mõjutaks DNA hilisemat analüüsi.

▼**M6**

1. „Reaktsioonisegu" ettevalmistamine (25 µl ühe proovi kohta):

	Maht	Lõppkontsentratsioon
Maatriks-DNAd	0,5–2 µl	
10x PCR-puhvrit $MgCl_2$-ga	2,5 µl	1 x
Nukleotiide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, igaühte)	4 µl (5 mM)	200 µM
Päripidist praimerit (10 µM) (vt allpool 3–5)	0,5 µl	200 nM
Äraspidist praimerit (10 µM) (vt allpool 3–5)	0,5 µl	200 nM
Dimetüülsulfoksiidi (DMSO)	1,25 µl	5 %
Vett (PCR jaoks sobiva puhtusega)	kuni 25 µl-ni	
Taq E-polümeraasi	0,3 µl	1,5 U
10x PCR-puhver $MgCl_2$-ga: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 25 °C juures), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 0,1 % Tween 20		

Iga PCR-reaktsiooni jaoks (vt allpool 3–5) on vaja spetsiaalset praimerit, mis on uus „reaktsioonisegu" ja matriits-DNA piisava vajaliku koguse kombinatsioon. Vastavad kogused kantakse üle uutesse torudesse pipettidega. Pärast seda kõik katseklaasid suletakse, segatakse (umbes 10 sekundit) ja tsentrifuugitakse (10 sekundit, toatemperatuuril). Nüüd võib alustada vastavaid PCR-programme. Lisaks kasutatakse igas PCR-programmis veel üht positiivset kontrolli (näidis-DNA-proov, millel on teadaolev aktiivsus ja selged tulemused), ja üht negatiivset kontrolli (1 µl dest. H_2O).

2. Agaroosgeeli (1 %) valmistamine – PCR-programmi toimumise ajal:

— Lahustage 3 g agaroosi 300 ml-s 1 × TAE-puhvris (1 % agaroosgeel)

— Seda lahust tuleks keeta mikrolaineahjus (ligikaudu 2–3 minutit)

— Viige kuum lahus üle spetsiaalsesse valamiskarpi, mis asub jää peal

— Umbes 20 minuti pärast on agaroosgeel valmis kasutamiseks

— Säilitage agaroosgeeli 1 × TAE-puhvris kuni PCR-programmide lõpuni

3. Aktiin-PCR-programm:

Selle PCR-reaktsiooni eesmärk on tõendada, et proovis olev DNA ei ole kahjustatud.

— Spetsiaalne praimer:

„Mact1 (upper/forward)" → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact 2 (lower/reverse)" → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Programm:

5 minutit temperatuuril 95 °C

Tsükkel (35 korda):

Denatureerimine → 45 s 95 °C juures

Karastamine → 45 s 56 °C juures

Pikendamine → 1 minut 68 °C juures

15 minutit temperatuuril 68 °C

▼M6

4. X- ja Y-geeni PCR-programm:

Selles PCR-programmis kasutatakse terve DNA proove selleks, et kontrollida X- ja Y-geene. Isaskala DNA peaks ilmuma kahe vöödina ja emaskala DNA üheainsa vöödina (pärast värvimist ja geel-elektroforeesi). Selle programmi tegemisel kasutatakse ühte isaskala (XY-näidis) ja üht emaskala (XX-näidis) positiivset kontrolli.

— Spetsiaalne praimer:

„PG 17.5” (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6” (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programm:

5 minutit temperatuuril 95 °C

Tsükkel (40 korda):

Denatureerimine	→ 45 s 95 °C juures
Karastamine	→ 45 s 55 °C juures
Pikendamine	→ 1 min 30 s 68 °C juures

15 minutit temperatuuril 68 °C

5. Y-geeni PCR-programm „kontroll” X- ja Y-geeni PCR-programmi puhul:

Selle PCR-programmiga kontrollitakse X- ja Y-geeni PCR-programmi tulemusi. Isaskala proovidel peaks ilmuma üks vööt ja emaskala proovidel mitte ühtegi vööti (pärast värvimist ja geel-elektroforeesi).

— Spetsiaalne praimer:

„DMTYa (upper/forward)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (lower/reverse)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programm:

5 minutit temperatuuril 95 °C

Tsükkel (40 korda):

Denatureerimine	→ 45 s 95 °C juures
Anniilimine	→ 45 s 56 °C juures
Elongatsioon	→ 1 minut 68 °C juures

15 minutit temperatuuril 68 °C

6. PCR-proovide värvimine:

Värvimislahus:

50 % glütserool

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % broomfenoolsinist

0,25 % ksüleentsüanooli

Pipetiga kantakse 1 µl värvimislahust igasse torusse

7. Geel-elektroforeesi alustamine:

— Ettevalmistatud 1 % agaroosgeel kantakse üle geel-elektroforeesikambrisse, mis on täidetud 1 × TAE-puhvriga

— 10–15 µl igast värvitud PCR-proovist viiakse pipetiga agaroosgeeli pilusse

— Eraldi pilusse kantakse ka 5–15 µl 1kb-„redelit” (Invitrogen)

— Elektroforeesi alustatakse 200 V juures

— Elektroforees peatatakse 30-45 minuti pärast

▼**M6**

8. Võõtide määramine:

— Agaroosgeel puhastatakse destilleeritud vees

— Seejärel kantakse agaroosgeel etiidiumbromiidi sisse 15–30 minutiks

— Seejärel pildistatakse agaroosgeeli UV-valguse all

— Lõpuks analüüsitakse proove ja võrreldakse neid positiivse kontrolli võõdi (või võõtidega) ja redeliga

▼M6

10. liide

Juhend koeproovide võtmiseks, et määrata polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR-) meetodil ogaliku geneetiline sugu

Koeproovide võtmine ja DNA eraldamine

DNA saab eraldada mitmesuguste müügil olevate reaktiivide abil kas käsitsi või automaatse DNA-eraldussüsteemiga. Allpool on esitatud Cefas Weymouthi laboris kasutatav eeskiri; sobival juhul on lisatud ka alternatiivseid võimalusi.

1. Väikeste kääridega lõigatakse igast kalast väike tükk kude (10–20 mg) seljakülgmisest osast (pärast pea ja saba eemaldamist vitellogeniini analüüsiks). Kude pannakse viaali ja paigutatakse kas vedelasse lämmastikku säilitamiseks temperatuuril – 80 °C või täidetakse viaal 70 % etanooliga (transpordiks ja säilitamiseks temperatuuril 4 °C). Käärid puhastatakse pärast iga kala lõikamist 70 % etanooliga, seejärel destilleeritud veega ja kuivatatakse kuivatuspaberiga.

2. Etanool (kui see lisati) eemaldatakse aspireerimisega ja kudesid lagundatakse hommikuni proteinaas K-ga 400 µl-s ATL-puhvris (Qiagen). Lagundatud koe alikvoot (200 µl) kantakse üle 96 süvendiga S-plokile (Qiagen) ja DNA eraldatakse 96 süvendiga vormist, kasutades Qiagen'i universaalbiorobotit ja QIamp'i teadlase bioroboti komplekti. DNA-d elueeritakse 50 µl veega, milles ei tohi olla DNaase ega RNaase. Kui DNA eraldamiseks kasutatakse kõvu kudesid (nt lülisammast või rinnauime), võib olla vajalik proovi homogeenimine lüüsipuhvris, kasutades FastPrep® koelagundajat või muud samaväärset kudede purustamise süsteemi.

   Teised võimalused

   a) Kude lagundatakse öö läbi proteinaas K-ga 400 µl-s lüüsipuhvris G2 (Qiagen) ja DNA eraldatakse 200 µl-st lüüsitud lahusest, kasutades kas EZ-1 DNA easy tissue komplekti ja biorobotit EZ-1 või DNA *easy tissue* minikomplekti. DNA elueeritakse 50 µl veega.

   b) Kudesid töödeldakse reaktiiviga DNAzol. Lühidalt öeldes lüüsitakse koeproove 1 ml DNAzol'iga 10 minutit 1,5 ml mikrotsentrifuugitopsis ja tsentrifuugitakse siis kiirusega 13 000 p/min 5 minutit, et eemaldada kõik tahked osakesed. Lüüsitud proov viiakse seejärel üle uude 1,5 ml mikrotsentrifuugitopsi, milles on 500 µl 100 % molekulaarbioloogias vajaliku puhtusastmega etanooli ja seejärel tsentrifuugitakse kiirusega 13 000 p/min 10 minutit, et sadestada DNA. Etanool eemaldatakse ja asendatakse 400 µl 70 % molekulaarbioloogias vajaliku puhtusastmega etanooliga, tsentrifuugitakse kiirusega 13 000 p/min 5 minutit ja DNAd sisaldav sade lahustatakse 50 µl vees, milles ei tohi olla DNaase ega RNaase. Jällegi, kui kasutatakse kõvu kudesid (nt rinnauime), võib olla vajalik proovi homogeenimine lüüsipuhvris, kasutades FastPrep® koelagundajat või muud samaväärset kudede purustamise süsteemi.

3. DNA säilitatakse – 20 °C juures, kuni seda läheb vaja.

Oluline märkus: töö ajal tuleb kanda kindaid.

Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) analüüs

Amplifitseerimine viidi läbi 2,5 µl eraldatud DNA-ga reaktsioonisegu 50 µl mahu juures, kasutades Idh-lookuse praimereid (nagu on kirjeldatud Peichel *et al.*, 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Päripidine praimer	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Äraspidine praimer	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼**M6**

Sobivate PCR-reaktiivide pakkujaid on palju. Allpool kirjeldatud meetodid kasutatakse praegusel ajal Cefas Weymouthi laboris.

1. *„Reaktsioonisegu" ettevalmistamine (50 µl ühe proovi kohta):*

Põhisegu valmistatakse järgmiselt. Selle saab ette valmistada ja säilitada külmutatult – 20 °C juures, kuni seda vaja läheb. Valmistage piisav kogus põhisegu negatiivse kontrolli jaoks (molekulaarbioloogias vajaliku kvaliteediga vesi).

	Ruumala (põhilahuse konts) /proov	Lõppkontsentratsioon
5xGoTaq® reaktsioonipuhver	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotiidid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM igaühte)	250 µM igaühte
Päripidine praimer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Äraspidine praimer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Molekulaarbioloogias vajaliku puhtusega vesi	30,75 µl	
GoTaq polümeraas	0,25 µl	1,25 Ü

— Viige 47,5 µl märgistatud õhukeseseinalisse 0,5 ml PCR-viaali.

— Lisage asjakohase märgisega viaali 2,5 µl puhastatud DNAd. Korrake sama kõikide proovide ja negatiivse kontrolli puhul.

— Lisage selle peale 2 tilka mineraalõli. Teise võimalusena võite kasutada kuumutatud kaanega termotsüklerit.

— Sulgege kaaned.

— Proovid denatureeriti Peltier PTC-225 termotsükleris 5 minutit temperatuuril 94 ± 2 °C, millele järgnes 39 tsüklit temperatuuril 94 ± 2 °C 1 minut, 55 ± 2 °C 1 minut, 72 ± 2 °C 1 minut ning lõplik pikendamine temperatuuril 72 ± 2 °C 10 minutit.

2. *Agaroosgeeli (2 %) ettevalmistamine:*

Tavaliselt lahutatakse PCR-reaktsiooni saadusi 20 % agaroosgeeliga, mis sisaldab etiidiumbromiidi.

Samuti võib kasutada kapillaaridel põhinevat elektroforeesisüsteemi.

— Kaaluge 2 g agaroosi 100 ml-sse 1 × TAE-puhvrisse

— Kuumutage mikrolaineahjus (ligikaudu 2–3 min), et agaroos lahustuks.

— Lisage 2 tilka etiidiumbromiidi lõpliku kontsentratsiooni 0,5 µg/ml saamiseks

— Kandke kuum lahus üle geelivalamisseadmesse.

— Laske geelil tarduda

3. *Geel-elektroforees:*

— Viige agaroosgeel üle elektroforeesiseadmesse ja katke see 1 × TAE-puhvriga

— Laadige 20 µl igast proovist eraldi süvendisse, lisage molekulmassimarker (100 aluspaari DNA-redel, Promega) kasutamata süvendisse.

— Tehke elektroforeesi 120 V juures 30–45 minutit.

▼**M6**

4. *Amplifikatsioonisaaduste nähtavakstegemine*

Kui kasutatakse etiidiumbromiidilisandiga agaroosgeeli, nagu on kirjeldatud eespool, on DNA-saadused nähtavad UV-lambi all. Teise võimalusena võib agaroosgeeli värvida: geel kaetakse etiidiumbromiidi lahja lahusega (0,5 μg/ml vees) 30 minutiks enne tulemuste vaatlemist.

▼M6

11. liide

Juhend ogaliku marja kunstliku viljastamise kohta

Käesolevas liites kirjeldatakse meetodit ogaliku viljastatud marjaterade saamiseks, et kasutada neid kalade sugulise arengu katses.

Töö käik

Seemnevedeliku kogumine isaskaladelt

1. Soovitud populatsioonist valitud hästi värvunud isaskala surmatakse valutult.

2. Niisk lõigatakse kala kummaltki küljelt välja. *Niisk on üldiselt tugevasti pigmenteerunud pulgakujuline elund, mis on kergesti nähtav keha külgjoonel*. Kasutatakse üht järgmistest meetoditest:

3. Väikeste kääridega tehakse üks 1–1,5 cm pikkune sisselõige alates kloaagist umbes 45° nurga all.

4. Skalpelliga tehakse väike sisselõige kala küljesse veidi tagapool kõhuuime ja kõhu pool küljeplaate.

5. Niisk eemaldatakse peente näpitsatega ja pannakse Petri tassile.

6. Kumbki niisk kaetakse 100 µl värskelt valmistatud **Hanki lõpliku lahusega** ([1]).

7. Niisad lõigatakse žiletitera või skalpelliga väikesteks kuubikuteks. See vabastab seemnevedeliku, mis muudab Hanki lahuse piimjaks.

8. Seemnevedelikku sisaldav lahus viiakse üle viaali, püüdes pipeteerimisel mitte kaasa võtta koetükke.

9. Viaali lisatakse 800 µl Hanki lõplikku lahust ja segatakse hoolikalt.

10. Vajaduse korral võib isaskala säilitada; selleks fikseeritakse ta 100 % etanooli või muu soovitud fikseeriva lahusega. See on eriti oluline juhul, kui uuringuga hinnatakse järglaste vanemlikku päritolu.

Oluline märkus: *kuigi enamiku vajaminevatest põhilahustest võib varem valmis teha, tuleb* ***põhilahus 5*** *ja seejärel* **lõplik lahus** *valmistada* **värskelt** *kasutamise päeval*.

Põhilahus 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilleeritud vesi (DV)	100 ml

Põhilahus 2

Na_2HPO_4 (veevaba)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DV	100 ml

Põhilahus 3

$CaCl_2$	0,72 g
DV	50 ml

([1]) Hanki puhverdatud soolalahus (HBSS):

HBSS on vajalik seemnevedeliku säilitamiseks, kui seda valmistatakse ette viljastamiseks.

▼M6

Põhilahus 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
DV	50 ml

Põhilahus 5 (värskelt valmistatud)

$NaHCO_3$	0,35 g
DV	10 ml

Märkus: Kui teil on mõni eespool nimetatud sooladest juba olemas, kuid erineva veesisaldusega (nt $2H_2O$ veevaba asemel), võite seda kasutada, olles koguse molekulmassi alusel ümber arvutanud.

Hanki lõpliku lahuse valmistamiseks võtke põhilahuseid järgmises järjekorras:

põhilahus 1	1,0 ml
põhilahus 2	0,1 ml
põhilahus 3	0,1 ml
DV	8,6 ml
põhilahus 4	0,1 ml
põhilahus 5	0,1 ml

Enne kasutamist segada korralikult.

Viljastamine

1. Soovitud populatsiooni hulgas tehakse kindlaks suured marja heitmiseks valmis emaskalad; emaskala on selleks valmis üksnes siis, kui marjateri võib näha kloaagist välja tungimas. Valmis emaskalad on iseloomulikus „pea ülespoole” asendis.

2. Libistage sõrme või pöidlaga ettevaatlikult mööda kala külge saba suunas, et stimuleerida marjakoti heitmist värskele Petri tassile. Korrake sama ka teise küljega ja pange kala oma nõusse tagasi.

3. Peene pintsliga võib marjaterad lükata laiali, nii et need moodustaksid ühekordse kihi. Oluline on püüda luua marjateradele võimalikult hea kokkupuude seemnevedelikuga; marjaterade pinna maksimeerimine tuleb seepärast kasuks. Oluline märkus: marjateri tuleb hoida niiskena nende ümber oleva niiske lapi abil (on oluline, et need ei puutuks otse kokku veega, kuna see põhjustaks koorioni kõvastumise, mis teeks viljastumise võimatuks). Emaskala koetavate marjaterade arv võib suuresti erineda, aga keskmiselt peaks ühelt kudemisvalmis emaskalalt saama 150 marjatera.

4. 25 µl seemnevedelikku Hanki segus määritakse pintsliga ühtlaselt laiali üle kõigi marjaterade. Marjaterad muutuvad kiiresti (ühe minutiga) kõvaks ja muudavad värvi, kui viljastumine on alanud. Kui marjateri on hinnanguliselt rohkem kui 150, tuleb seda etappi korrata. Kui munad ei kõvene ühe minuti jooksul, lisatakse veidi rohkem seemnevedelikku. Oluline märkus: seemnevedeliku koguse suurendamine ei paranda tingimata viljastumismäära.

5. Marjaterad ja seemnevedeliku lahus tuleks jätta vastastikku mõjuma vähemalt 15 minutiks ja viljastatud mari tuleks paigutada kemikaaliga kokkupuute akvaariumidesse 1,5 tunni jooksul pärast viljastamist.

6. Sama tegevust korratakse teiste emaskaladega, kuni on kogutud vajalik arv marjateri.

7. Mõned marjaterad viimasest partiist jäetakse alles ja fikseeritakse 10 % äädikhappelahuses.

▼M6

Marjaterade loendamine ja jaotamine katseakvaariumidesse

1. Marjaterad tuleks kontsentratsioonitasemete vahel jaotada ühtlaselt, et vältida geneetikast tingitud kõrvalekallet. Viljastatud marjaterade iga partii tuleb jaotada võrdse suurusega rühmadesse (mille arv vastab kontsentratsioonitasemete arvule), kasutades nüri instrumenti (nagu laia otsaga entomoloogipintsetid või bakterikülvide tegemisel kasutatav silmus). Kui kavatsete iga kontsentratsiooniga teha neli paralleelkatset à 20 marjatera, tuleks teil iga kontsentratsiooni akvaariumide vahel jaotada 80 marjatera. Oluline märkus: soovitatav on lisada täiendavalt 20 % marjateri (st 96 marjatera kontsentratsioonitaseme kohta), kui te ei ole veendunud, et saavutate viljastumismäära 100 %.

2. Ogaliku marjaterad on väga tundlikud seenenakkuse suhtes väljaspool pesa, mida kaitseb isakala. Seepärast on kõigi marjaterade töötlemine metüleensinisega esimese viie päeva jooksul äärmiselt oluline. Metüleensinise põhilahus valmistatakse kontsentratsiooniga 1 mg/ml ning seda lisatakse kemikaaliga kokkupuute akvaariumidesse, kuni saavutatakse lõppkontsentratsioon 2,125 mg/l. Oluline märkus: pärast koorumist ei tohiks ogalikud metüleensinisega enam kokku puutuda, nii et süsteem peaks 6. päevaks olema metüleensinisest vaba.

3. Marjateri kontrollitakse iga päev ja kõik surnud või viljastamata marjatera leidmise juhtumid registreeritakse. Oluline märkus: marjaterad ei tohiks kuni koorumiseni isegi väga lühikest aega olla väljaspool vett.

▼M6

C.42. BIOLAGUNDATAVUS MEREVEES

ÜLDINE SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 306 (1992). Esialgsete katsemeetodite väljatöötamise ajal ei olnud teada, millises ulatuses võib kiire biolagundatavuse sõelkatse tulemusi, mis on saadud magevee, reoveepuhastite väljavoolu ja aktiivmuda inokulumi abil, laiendada merekeskkonnale. Selle kohta on teatatud erinevaid tulemusi (vt näiteks (1)).

2. Paljud mitmesuguseid kemikaale sisaldavad tööstuslikud reoveed jõuavad merre kas reovee otsese keskkonda juhtimisega või suudmealade ja jõgede kaudu, milles reovesi viibib vähe aega, võrreldes nendes esinevate kemikaalide täielikuks biolagunemiseks kuluva ajaga. Kuna saab üha selgemaks, et merekeskkonda on vaja kaitsta suureneva kemikaalireostuse eest ja on vaja hinnata kemikaalide võimalikku kontsentratsiooni merevees, on välja töötatud meetodid biolagunduvuse määramiseks merevees.

3. Siin kirjeldatud meetodites on kasutatud looduslikku merevett nii veefaasina kui ka mikroorganismide allikana. Selleks et lähendada seda meetodit kiire biolagunduvuse määramise meetoditele magevee jaoks, uuriti ultrafiltritud ja tsentrifuugitud merevee kasutamist; inokulumina kasutati meresetteid. Need uuringud ei andnud tulemusi. Seepärast on katsekeskkonnaks looduslik merevesi, mida on eelnevalt töödeldud suuremate osakeste eemaldamiseks.

4. Täieliku biolagunduvuse hindamiseks tuleb loksutatava kolvi meetodi puhul kasutada uuritava aine suhteliselt suurt kontsentratsiooni, kuna lahustunud orgaanilise süsiniku määramise meetod on vähetundlik. See omakorda nõuab merevee mineraalsete toitainete (N ja P) lisamist, kuna muidu piiraks nende kontsentratsioon lahustunud orgaanilise süsiniku eemaldamist. Ka suletud pudeli meetodi puhul tuleb lisatava uuritava aine kontsentratsiooni tõttu lisada toitaineid.

5. Seega ei uurita kõnealuste meetoditega kiiret biolagunduvust, kuna inokulumi lisaks merevees juba olemasolevatele mikroorganismidele ei lisata. Samuti ei modelleerita nende katsete abil merekeskkonda, kuna lisatakse toitaineid ja uuritava aine kontsentratsioon on palju suurem, kui see oleks merevees. Seetõttu esitatakse need meetodid uues alljaotises „Biolagunduvus merevees”.

KOHALDAMINE

6. Need katsed, mida tehakse, kuna kõnealuse kemikaali kasutamis- ja kõrvaldamisviis osutavad kemikaali sattumisele merre, annavad tulemuseks esialgse pildi biolagundatavusest merevees. Kui tulemus on positiivne (üle 70 % lahustunud orgaanilisest süsinikust kõrvaldatud; hapnikukulu üle 60 % teoreetilisest hapnikutarbest), võib teha järelduse, et biolagunduvus merekeskkonnas on võimalik. Negatiivne tulemus siiski ei välista biolagunduvuse võimalikkust, kuid näitab, et on vaja täiendavaid uuringuid, näiteks uuritava aine võimalikult madala kontsentratsiooni juures.

▼M6

7. Juhul kui on vaja täpsemalt teada biolagunduvuse kiirust või määra merevees kusagil konkreetses kohas, tuleks kasutada keerukamaid ja täiuslikumaid ning seetõttu ka kulukamaid meetodeid. Näiteks modelleerimiskatsed võib teha ka uuritava aine kontsentratsiooniga, mis on lähemal oletatavale kontsentratsioonile keskkonnas. Kasutada võib ka toitainetega rikastamata ja eelnevalt töötlemata merevett, mis on võetud huvi pakkuvast kohast ja uurida primaarset biolagunduvust spetsiifilise keemilise analüüsiga. Täieliku biolagunduvuse uurimiseks tuleks kasutada C-märgistatud ainet, nii et oleks võimalik mõõta lahustuva orgaanilise ^{14}C kadumist ja $^{14}CO_2$ tekkimist keskkonna seisukohast realistlikel kontsentratsioonidel.

MEETODITE VALIMINE

8. Kasutatava meetodi valimine sõltub paljudest teguritest; järgmine tabel peaks hõlbustama valiku tegemist. Kuigi aineid, mille lahustuvus vees on väiksem kui 5 mg C/l vastav kontsentratsioon, ei saa uurida loksutatava kolvi meetodiga, võib vähelahustuvaid aineid siiski uurida kinnise pudeli meetodiga.

Tabel

Loksutatava kolvi ja kinnise pudeli katse eelised ja puudused

MEETOD	EELISED	PUUDUSED
LOKSUTATAV KOLB	— lihtne aparatuur, välja arvatud C analüsaator — kestus 60 päeva ei ole probleem — nitrifikatsioon ei sega uuringut — võib kasutada lenduvate ainete puhul	— on vaja C analüsaatorit — kasutatakse kontsentratsioone 5–40 mg lah. org. C /1, mis võib olla inhibeeriva toimega — lah. org. süsiniku määramine madalatel kontsentratsioonidel merevees on keeruline (kloriidi mõju) — lah. org. süsiniku kontsentratsioon on merevees mõnikord suur
KINNINE PUDEL	— lihtsad seadmed — lihtne määramine lõpus — kasutatakse madalat uuritava aine kontsentratsiooni (2 mg/l), seega on vähem inhibeerimise võimalusi — kerge on kasutada ka lenduvate ainete puhul	— pudelite hermeetilisuse säilitamine võib olla keeruline — bakterite kasv nõu seintel võib põhjustada valesid tulemusi — kontrollkatses võib O_2 sidumine muutuda intensiivseks eriti pärast 28 päeva; sellest võib üle saada merevee vanandamisega — segada võib nitrifikatsiooniga seotud O_2 sidumine

LOKSUTATAVA KOLVI MEETOD

SISSEJUHATUS

1. Kõnealune meetod on merevee jaoks kohandatud ja muudetud OECD sõelkatse, mida on kirjeldatud käesoleva lisa peatükis C.4B (2). See on lõpuni viimistletud Euroopa Komisjoni ja Taani veekvaliteedi instituudi korraldatud laboritevahelise võrdluskatsega (3).

2. Samuti kui sellele järgneva suletud pudeli meetodi mereveevariandi puhul, ei tohiks käesoleva meetodi tulemusest teha järeldust kiire biolagunduvuse kohta; meetodiga saadakse konkreetselt teavet biolagunduvuse kohta merekeskkonnas.

▼**M6**

MEETODI PÕHIMÕTE

3. Kindlaksmääratud kogus uuritavat ainet lahustatakse katsekeskkonnas, et saada kontsentratsioon vahemikus 5–40 mg lahustunud orgaanilist süsinikku liitri kohta. Kui orgaanilise süsiniku määramise analüüsi tundlikkust suurendatakse, siis võib olla eelistatud uuritava kemikaali madalama kontsentratsiooni kasutamine, eriti kui tegemist on inhibeeriva ainega. Uuritava kemikaali lahust katsekeskkonnas inkubeeritakse loksutamisega pimedas või hajutatud valguses aeroobsetes tingimustes kindlal temperatuuril (mida hoitakse täpsusega ± 2 °C), mis on tavaliselt vahemikus 15–20 °C. Kui katse eesmärk on modelleerida keskkonnaolukordi, võib katse teha väljaspool seda normaalset temperatuurivahemikku. Katse soovitatav suurim kestus on 60 päeva. Lagunemist jälgitakse lahustunud orgaanilise süsiniku mõõtmisega (täielik lagunemine) ja mõnel juhul spetsiifilise analüüsiga (primaarne lagunemine).

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

4. Selleks, et otsustada, kas katsemeetodit saab kasutada konkreetse aine puhul, peavad aine mõned omadused olema teada. Aine orgaanilise süsiniku sisaldus peab olema kindlaks määratud, aine lenduvus peab olema selline, et katse jooksul ei tekiks suuri aine kadusid ja aine lahustuvus vees peab olema suurem kui 25–40 mg süsinikku liitris. Samuti ei tohiks uuritav aine oluliselt adsorbeeruda klaasi pinnale. Teave uuritava aine puhtusastme või peamiste lisandite suhteliste koguste kohta on vajalik tulemuste tõlgendamiseks, eriti kui tulemus on biolagunduvuse kriteeriumi piiri lähedal.

5. Sobivate uuritavate kontsentratsioonide valimiseks võivad vajalikud olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta bakteritele, mis on mõõdetud näiteks lühiajalise respiratsioonikiiruse katsega (4); sellised andmed võivad olla ülivajalikud biolagunduvuse väärtuste õigeks tõlgendamiseks. Selline teave ei ole siiski alati piisav biolagunduvuse katse tulemuste tõlgendamiseks ning sobivam on punktis 18 kirjeldatud meetod.

VÕRDLUSAINED

6. Merevee proovi mikroobse aktiivsuse kontrollimiseks tuleb kasutada sobivaid võrdlusaineid. Selleks otstarbeks sobivad näiteks naatriumbensoaat, naatriumatsetaat ja aniliin. Võrdlusaine peab lagunema sobivalt lühikese ajavahemiku jooksul; vastasel korral soovitatakse katset korrata mõne muu mereveeprooviga.

7. Euroopa Ühenduse võrdluskatses, kus merevee proovid olid võetud eri kohtadest ja eri aastaaegadel (3), olid naatriumbensoaadi puhul ootefaas (t_L) ja 50 % lagunemiseks kuluv aeg (t_{50}) ilma ootefaasita vastavalt 1–4 päeva ja 1–7 päeva. Aniliini puhul oli t_L vahemikus 0–10 päeva ja t_{50} 1–10 päeva.

ANALÜÜSIMEETODI KORRATAVUS JA TUNDLIKKUS

8. Meetodi korratavus määrati laboritevahelise võrdluskatsega (3). Madalaim uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul kõnealust meetodit võib kasutada koos lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) sisalduse määramisega, on suuresti määratud orgaanilise süsiniku määramispiiriga (ligikaudu 0,5 mg C/l) ja DOC sisaldusega avamerevees (tavaliselt 3–5 mg/l). DOC taustkontsentratsioon ei tohiks ületada ligikaudu 20 % DOC üldkontsentratsioonist

▼M6

pärast uuritava materjali lisamist. Kui see ei ole teostatav, võib DOC taustkontsentratsiooni mõnikord vähendada merevee vanandamisega enne katse tegemist. Kui seda meetodit kasutatakse ainult koos konkreetse kemikaali määramisega (sel viisil mõõdetakse primaarset lagundamist), peab uurija kirjandusest saadud lisateabe abil näitama, kas võib oletada ka lõplikku lagunduvust. Lisateave võib hõlmata muude katsete tulemusi, millega tõendatakse kiiret või iseeneslikku biolagunduvust.

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

9. Tavalised laboriseadmed ja:

a. loksuti, millesse saab paigutada 0,5–2 liitrise mahuga Erlenmeyeri kolbe, kas temperatuuri automaatse reguleerimisega või võimalusega teha katse ruumis, mille temperatuur on konstantselt vahemikus 15–20 (± 2) °C;

b. kitsa kaelaga 0,5–2 liitrised Erlenmeyeri kolvid;

c. membraanfiltrimisseade või tsentrifuug;

d. membraanfiltrid 0,2–0,45 μm;

e. süsinikuanalüsaator;

f. varustus spetsiifiliste analüüside jaoks (ei ole kohustuslik).

Merevesi

10. Merevee proov võetakse hoolikalt puhastatud nõusse ja transporditakse laborisse eelistatavalt ühe või kahe päeva jooksul pärast võtmist. Transpordi ajal ei tohi proovi temperatuur tõusta oluliselt kõrgemale katses kasutatavast temperatuurist. Registreeritakse täpne proovivõtu koht ja kirjeldatakse merevee saasteainete ja toitainete sisaldust kõnealuses kohas. Eriti rannikulähedaste vete puhul esitatakse selles kirjelduses ka heterotroofsete mikroorganismide kolooniate arv, samuti lahustunud nitraadi, ammooniumi ja fosfaadi kontsentratsioon.

11. Merevee proovi enda kohta esitatakse järgmine teave:

— võtmise kuupäev;

— proovivõtu sügavus;

— proovi välimus – sogane vms;

— temperatuur proovi võtmise ajal;

— soolsus;

— lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus;

— ajavahemik proovivõtust kuni katseni.

12. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus merevees on kõrge (punkt 8), soovitatakse merevett umbes üks nädal vanandada enne kasutamist. Merevett vanandatakse hoidmisega aeroobsetes tingimustes katse temperatuuril ja pimeduses või hajunud valguses. Vajaduse korral tuleb aeroobsete tingimuste säilitamiseks kergelt aereerida. Vanandamise ajal väheneb kergesti

▼M6

biolagundatava orgaanilise materjali sisaldus. Laboritevahelises võrdluskatses (3) ei leitud vanandatud ja värskelt võetud mereveeproovide biolagundamise võimes mingeid erinevusi. Enne kasutamist töödeldakse merevett suuremate osakeste eemaldamiseks näiteks filtrimisega läbi nailonfiltri või jämeda paberfiltri (mitte kasutada membraan- või klaasmikrokiud- (GF/C-)filtrit) või setitamise ja dekanteerimisega. Kasutatud menetlust tuleb kirjeldada. Kui kasutatakse eeltöötlemist, tuleb see teha pärast vanandamist.

Mineraaltoitainete põhilahused

13. Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.

a) kaaliumdivesinikortofosfaat, KH_2PO_4 8,50 g

dikaaliumvesinikortofosfaat, K_2HPO_4 21,75 g

dinaatriumvesinikortofosfaatdihüdraat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

ammooniumkloriid, NH_4Cl 0,50 g

lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.

b) kaltsiumkloriid, $CaCl_2$ 27,50 g

lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.

c) magneesiumsulfaatheptahüdraat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.

d) raud(III)kloriidheksahüdraat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.

Sadenemist lahuses d saab ära hoida ühe tilga kontsentreeritud soolhappe või 0,4 g etüleendiamiintetraäädikhappe (EDTA dinaatriumsool) lisamisega 1 liitri lahuse kohta. Kui põhilahuses tekib sade, asendatakse see värskelt valmistatud lahusega.

Katsekeskkonna valmistamine

14. Eeltöödeldud merevee ühe liitri kohta lisatakse 1 ml kumbagi eespool kirjeldatud põhilahust.

Inokulum

15. Merevees juba olemasolevatele mikroorganismidele ei lisata spetsiaalset inokulumi. Mereveest saadud katsekeskkonnas (ja soovitatavalt ka esialgses merevee proovis) määratakse (soovi korral) kolooniat moodustavate heterotroofsete bakterite arv, näiteks kolooniate loendamisega mereveeagari plaadil. See on eriti soovitatav proovide puhul, mis on võetud rannikuveest või saastatud merealalt. Heterotroofsete mikroobide aktiivsust kontrollitakse nii, et katse tehakse võrdlusainega.

▼M6

Kolbide ettevalmistamine

16. Kõik klaasnõud peavad olema hoolikalt puhastatud (kuigi mitte tingimata steriilsed) näiteks soolhappe alkoholilahusega, loputatud ja kuivatatud, et vältida saastavaid jääke varasematest katsetest. Puhastada tuleb ka kolvid, mida kasutatakse esimest korda.

17. Uuritavat ainet hinnatakse samaaegselt kahes paralleelkatsekolvis ja lisaks tehakse samal ajal ühes kolvis katse võrdlusainega. Analüüsi tühiproovide määramiseks tehakse tühikatse kahe paralleelkatsena, millesse ei panda ei uuritavat ainet ega võrdlusainet. Uuritav aine lahustatakse katsekeskkonnas – ainet võib mugavalt lisada kontsentreeritud põhilahusena, et saada vajalik lähtekontsentratsioon, mis tavaliselt on 5–40 mg DOC/l. Võrdlusainega tehakse tavaliselt katse lähtekontsentratsioonil, mis vastab kontsentratsioonile 20 mg DOC/l. Kui kasutatakse uuritava kemikaali ja/või võrdluskemikaali põhilahuseid, tuleb tagada, et merevee soolsus katsekeskkonnas oluliselt ei muutuks.

18. Kui võib eeldada või ei saa välistada toksilist mõju, siis võib olla soovitatav lisada katse kavasse ka inhibeerimiskatse kahe paralleeliga. Ühte ja samasse nõusse lisatakse uuritavat ainet ja võrdlusainet, kusjuures võrdlemise võimaldamiseks on võrdlusaine kontsentratsioon tavaliselt sama kui kontrollkatses (st 20 mg DOC/l).

19. Erlenmeyeri kolbidesse pannakse vajalikud kogused uuritavat lahust (sobiv lahusekogus on ligikaudu pool kolvi mahust) ning seejärel kaetakse iga kolb vabalt lebava kattega (näiteks alumiiniumfooliumiga), mis võimaldab gaasivahetust kolvis oleva ja ümbritseva õhu vahel. (Puuvillvatist korgid ei sobi lahustunud orgaanilise süsiniku analüüsi puhul.) Nõud pannakse loksutile ja neid loksutatakse kogu katse jooksul pidevalt mõõduka kiirusega (nt 100 pööret minutis). Temperatuur hoitakse vahemikus 15–20 (± 2) °C ning nõusid varjatakse valguse eest, et vältida vetikate kasvu. Tagatakse, et ruumi õhus ei oleks mürgiseid aineid.

Füüsikalis-keemilised kontrollkatsed (soovi korral)

20. Kui kahtlustatakse abiootilist lagunemist või kadu, nt hüdrolüüsi (mis tekitab raskusi üksnes konkreetse aine määramise puhul), lendumist või adsorptsiooni, on soovitatav teha füüsikalis-keemiline kontrollkatse. Seda võib teha elavhõbe(II)kloriidi ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) lisamisega uuritava aine lahusesse, et peatada mikroobide tegevus. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine kontsentratsioon füüsikalis-keemilises kontrollkatses ikkagi väheneb, osutab see abiootiliste kõrvaldamismehhanismide mõjule. (Kui kasutatakse elavhõbekloriidi, tuleks tähelepanu pöörata lahustunud orgaanilise süsiniku analüüsi segamise või katalüsaatori mürgitamise võimalusele.)

Kolbide arv

21. Tüüpilises katses kasutatakse järgmisi kolbe:

kolvid 1 ja 2	sisaldavad uuritavat ainet (uuritavat suspensiooni);
kolvid 3 ja 4	sisaldavad üksnes merevett (tühikatse);
kolb 5	sisaldab võrdlusainet (määramise õigsuse kontroll);
kolb 6	sisaldab uuritavat kemikaali ja võrdlusainet (mürgisuse kontroll – soovi korral);
kolb 7	sisaldab uuritavat kemikaali ja steriliseerivat vahendit (abiootiline steriilne kontroll – soovi korral).

([1]) Elavhõbe(II)kloriid ($HgCl_2$) on väga mürgine aine, mille käsitsemisel tuleb järgida vajalikke ohutuseeskirju. Kõnealuse kemikaali vesilahused tuleks kõrvaldada ettenähtud korras; neid ei tohi lasta kanalisatsioonisüsteemi.

▼M6

Lahustunud orgaanilise süsiniku analüüs

22. Katse ajal võetakse sobivate ajavahemike järel (1. liide) proovid lahustunud orgaanilise süsiniku analüüsiks. Alati võetakse proovid katse alguses (0-päev) ja 60. päeval. Kokku on lagunemise ajast sõltuvuse graafiku koostamiseks vaja katse ajal võtta vähemalt viis proovi. Proovivõtu kindlat ajagraafikut ei ole võimalik ette näha, kuna biolagunemine võib toimuda mitmesuguse kiirusega. Igast proovist määratakse lahustunud orgaaniline süsinik kaks korda.

Proovide võtmine

23. Proovi vajalik maht sõltub spetsiifilisest analüüsimeetodist, kasutatavast süsinikuanalüsaatorist ja meetodist, mis valitakse proovi töötlemiseks enne süsiniku määramist (punktid 25 ja 26, membraanfiltrimine või tsentrifuugimine). Enne proovi võtmist tuleb katsekeskkonda hästi segada, et materjal, mis võib olla kleepunud kolvi seina külge, lahustuks või läheks üle suspensiooni.

24. Kohe pärast proovi võtmist filtritakse proov läbi membraani või tsentrifuugitakse. Vajaduse korral säilitatakse filtritud või tsentrifuugitud proove 2–4 °C juures kuni 48 tundi või allpool – 18 °C pikemat aega (kui on teada, et see ei mõjuta ainet, viiakse pH enne säilitamist 2 juurde).

25. Membraanfiltreid (0,2–0,45 μm) saab kasutada siis, kui on tõendatud, et need filtrimise ajal ei vabasta süsinikku ega adsorbeeri ainet; sobivad näiteks polükarbonaatmembraanfiltrid. Mõned membraanfiltrid on hüdrofiilsuse suurendamiseks immutatud pindaktiivsete ainetega ja neist võib vabaneda olulises koguses lahustunud süsinikku. Selliseid filtreid tuleb ette valmistada keetmisega deioniseeritud vees kolme järjestikuse ajavahemiku jooksul, iga kord üks tund. Pärast keetmist hoitakse filtreid deioniseeritud vees. Filtraadi esimesed 20 ml visatakse ära.

26. Membraanfiltrimise asemel võib proove tsentrifuugida. Proovi tsentrifuugitakse kiirendusega 40 000 $m \cdot s^{-2}$ (umbes 4 000 g) 15 minutit, eelistatavalt jahutusega tsentrifuugis.

Märkus: Orgaanilise süsiniku üldsisalduse (TOC) ja lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) lahutamine tsentrifuugimisega ei õnnestu väga väikese sisalduse juures, kuna sellega kas ei kõrvaldata kõiki baktereid või läheb osa bakterite rakuplasmas olevast süsinikust lahusesse. Kõrgematel kontsentratsioonidel (> 10 mg C/l) näib tsentrifuugimise viga olevat suhteliselt väike.

Proovide võtmise sagedus

27. Kui analüüs tehakse kohe pärast proovi võtmist, võib järgmise proovi võtmise aja hinnata analüüsi tulemuse põhjal.

28. Kui proove säilitatakse, et teha analüüs hiljem (vt punkt 24), võetakse proove rohkem kui viis minimaalselt nõutavat proovi. Tehke viimaste proovide analüüsid kõigepealt, siis võite järk-järgult valida analüüsi tegemiseks varasemaid proove niimoodi, et saada korralik biolagunemise kõver suhteliselt väikse arvu analüüside tegemisega. Kui katse lõpuks ei ole lagunemist toimunud, ei ole rohkem proove vaja analüüsida, ja sellel juhul võib analüüsiks proovide „tagurpidine” valimine aidata analüüsikulusid oluliselt vähendada.

▼M6

29. Kui enne 60 päeva möödumist jõuab lagunemise kõver platoole, siis lõpetatakse katse. Kui 60. päevaks on lagunemine selgelt alanud, kuid ei ole platoole jõudnud, tuleb katset pikendada.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

30. Analüüsi tulemused kantakse lisatud andmelehele (2. liide) ja nii uuritava aine kui ka võrdlusaine biolagundamise väärtused arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

kus:

D_t = lahustunud orgaanilise süsiniku lagunemine või konkreetse aine kadumine keskkonnast protsentides ajahetkeks t,

C_o = lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine algkontsentratsioon katsekeskkonnas,

C_t = lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine algkontsentratsioon katsekeskkonnas ajahetkeks t,

$C_{bl(0)}$ = lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine algkontsentratsioon katsekeskkonnas tühikatses,

$C_{bl(t)}$ = lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine algkontsentratsioon katsekeskkonnas tühikatses ajahetkeks t.

31. Lagunemine väljendatakse lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsendina (lõplik lagunemine) või konkreetse aine kõrvaldamise protsendina (primaarne lagunemine) ajahetkeks t. Lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioonid arvutatakse täpsusega 0,1 mg/l ja D_t keskväärtused ümardatakse ülespoole lähima täisarvulise protsendini.

32. Lagunemise käik esitatakse graafiliselt, nagu on näidatud joonisel punktis „Tulemuste nõuetekohasus ja tõlgendamine”. Kui tulemusi on piisavalt, arvutatakse kõverast ootefaas (t_L) ja aeg, mis kulub ootefaasi lõpust kuni 50 % biolagunemise saavutamiseni (t_{50}).

Katseprotokoll

33. Katseprotokollis tuleb esitada järgmine teave:

Uuritav aine:

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— identifitseerimisandmed.

Katsetingimused:

— proovivõtu koht ja selle kirjeldus; merevee saastatus (kolooniate arv) ja toitainete (nitraat, ammoonium, fosfaat, kui see on asjakohane) sisaldus;

— proovi iseloomustavad andmed (proovivõtu kuupäev, sügavus, proovi välimus, temperatuur, soolsus, lahustunud orgaaniline süsinik (soovi korral), proovi võtmise ja katses kasutamise vaheline ajavahemik;

▼**M6**

— meetod, mida kasutati merevee vanandamiseks (kui vanandati);

— meetod, mida kasutati merevee eeltöötluseks (filtrimine/sedimentatsioon);

— lahustunud orgaanilise süsiniku määramise meetod;

— meetod konkreetse kemikaali määramiseks (soovi korral);

— meetod, mida kasutati merevee heterotroofide arvu määramiseks (plaadil loendamise meetod või muu meetod) (soovi korral);

— muud meetodid (soovi korral) merevee iseloomustamiseks (ATP mõõtmine jne).

Tulemused:

— analüüsiandmed andmelehel (2. liide);

— lagunemise käik esitatakse graafikuna diagrammil, mis näitab ootefaasi (t_L), tõusu ja aega (alates ootefaasi lõpust), mis kulub 50 % lagunemise saavutamiseks (t_{50}). Ootefaasi pikkuse võib hinnata graafiliselt, nagu on näidatud joonisel punktis „Tulemuste nõuetekohasus ja tõlgendamine”; mugavam on võtta ootefaasiks aeg, mis kulub 10 % lagunemiseks;

— lagunemise protsent pärast 60 päeva, või katse lõpus.

Tulemuste arutelu.

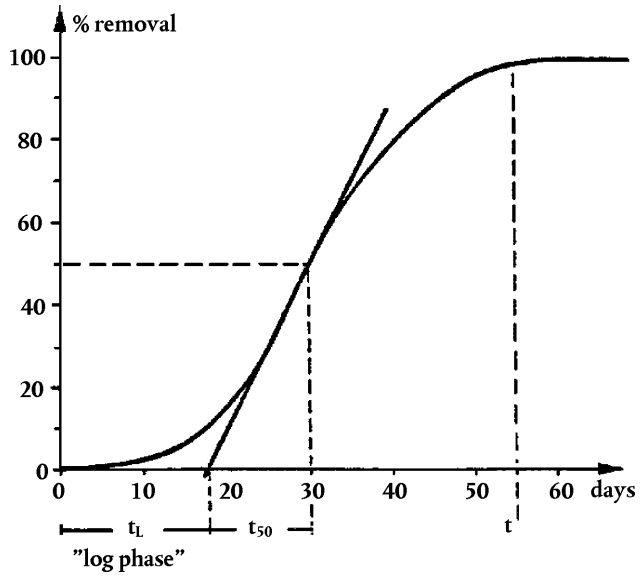
Tulemuste nõuetekohasus ja tõlgendamine

34. Võrdlusainetega nagu naatriumbensoaat, naatriumatsetaat ja aniliin saadud tulemused peaksid olema võrreldavad tulemustega, mis saadi laboritevahelises võrdluskatses (3) (vt punkt 7 „Võrdlusained”) Kui võrdlusainetega saadud tulemused on ebatüüpilised, tuleb katset korrata muu mereveeprooviga. Kuigi inhibeerimiskatsete tulemusi ei saa alati üheselt tõlgendada, kuna uuritav aine annab ka ise panuse lahustunud orgaanilise süsiniku kogusesse, on lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise üldkiiruse oluline vähenemine kontrolliga võrreldes selge tunnus mürgise mõju kohta.

35. Kuna katses kasutatakse suhteliselt suurt uuritava aine kontsentratsiooni võrreldes enamiku looduses esinevate kontsentratsioonidega (ja seega on uuritava aine ja muude süsinikuallikate suhtarv ebasoodne), peetakse seda meetodit eelkatseks, mis näitab, kas aine on kergesti biolagunduv või ei ole. Sellest tulenevalt ei tähenda madal katsetulemus tingimata seda, et aine ei ole merevees biolagunev; see näitab, et biolagundatavuse kindlakstegemiseks on vaja teha rohkem uuringuid.

Järgmisel joonisel on esitatud lagunemiskatse teoreetiline kõver, mis näitab, kuidas saab hinnata ootefaasi („*lag phase*”) pikkust t_L ja ajavahemikku t_{50}, mis algab ajahetkest t_L ja on vajalik 50 % lagunemise saavutamiseks.

▼M6



KINNISE PUDELI MEETOD

SISSEJUHATUS

1. See meetod on kinnise pudeli katse (5) mereveevariant ning see on lõpuni viimistletud Euroopa Komisjoni ja Taani veekvaliteedi instituudi korraldatud laboritevahelise võrdluskatsega (3).

2. Samuti kui loksutatava kolvi meetodi mereveevariandi puhul, ei tohiks käesoleva meetodi tulemusest teha järeldust kiire biolagunduvuse kohta; meetodiga saadakse konkreetset teavet biolagunduvuse kohta merekeskkonnas.

MEETODI PÕHIMÕTE

3. Eelnevalt kindlaksmääratud kogus uuritavat ainet, tavaliselt 2–10 mg ühe liitri kohta, lahustatakse katsekeskkonnas (võib kasutada ühte või mitut kontsentratsiooni). Lahust hoitakse täidetud suletud pudelis pimeduses konstantsel temperatuuril vannis või termokambris temperatuuril 15–20 (± 1) °C. Juhul, kui katse eesmärk on modelleerida keskkonnaolukordi, võib katse teha väljaspool seda normaalset temperatuurivahemikku, tingimusel et temperatuuri kontrollimine on vajalikul viisil seadistatud. Lagunemist jälgitakse 28 päeva jooksul hapniku analüüside abil.

4. Laboritevaheline võrdluskatse näitas, et kui katset pikendati üle 28 päeva, ei saadud enamikul juhtudel mingit kasulikku teavet, kuna tekkisid rängad segavad asjaolud. Tühikatse bioloogilise hapnikutarbe (BHT) väärtused olid väga kõrged, arvatavasti mikroorganismide kasvu tõttu pudeli seintel, kuna pudeleid ei loksutata, samuti nitrifikatsiooni tõttu. Seega on soovituslik kestus 28 päeva, kuid kui tühikatse BHT väärtus jääb 30 protsendi juurde (punktid 15 ja 40), siis võiks katset pikendada.

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

5. Selleks, et otsustada, kas katsemeetodit saab kasutada teatava konkreetse aine puhul, peavad aine mõned omadused olema teada. Empiiriline valem on vajalik teoreetilise hapnikutarbe (THT) arvutamiseks (vt 3. liide); vastasel korral tuleb määrata aine keemiline hapnikutarve (KHT), et kasutada seda võrdlusväärtusena. Keemilise hapnikutarbe kasutamine ei ole eriti hea, kuna mõnda ainet ei oksüdeerita keemilise hapnikutarbe määramise katses täielikult.

▼M6

6. Aine lahustuvus peaks olema vähemalt 2 mg/l, kuigi põhimõtteliselt võiks määrata ka halvemini lahustuvaid aineid (nt ultrahelitöötluse abil), samuti saab uurida lenduvaid aineid. Teave uuritava aine puhtusastme või peamiste lisandite suhteliste koguste kohta on vajalik tulemuste tõlgendamiseks, eriti kui tulemus on biolagunduvuse kriteeriumi piiri lähedane.

7. Sobivate uuritavate kontsentratsioonide valimiseks võivad väga kasulikud olla andmed uuritava aine mürgisuse kohta bakteritele, mis on mõõdetud näiteks lühiajalise respiratsioonikiiruse katsega (4); sellised andmed võivad olla ülivajalikud biolagunduvuse väärtuste õigeks tõlgendamiseks. Selline teave ei ole siiski alati piisav biolagunduvuse katse tulemuste tõlgendamiseks ning sobivam on punktis 27 kirjeldatud meetod.

VÕRDLUSAINED

8. Merevee proovi mikroobse aktiivsuse kontrollimiseks tuleb kasutada sobivaid võrdlusaineid. Sellel eesmärgil võib kasutada (näiteks) aniliini, naatriumatsetaati või naatriumbensoaati. Võrdlusaine peab lagunema vähemalt 60 % ulatuses (aine THT järgi) mingi sobivalt lühikese ajavahemiku jooksul; vastasel korral soovitatakse katset korrata mõne muu mereveeprooviga.

9. Euroopa Ühenduse võrdluskatses, kus merevee proovid olid võetud eri kohtadest ja eri aastaaegadel, olid naatriumbensoaadi puhul ootefaas (t_L) ja 50 % lagunemiseks kuluv aeg (t_{50}) ilma ootefaasita vastavalt 0–2 päeva ja 1–4 päeva. Aniliini puhul olid t_L ja t_{50} väärtused vastavalt 0–7 ja 2–12 päeva.

KORRATAVUS

10. Meetodite korratavus määrati ELi laboritevahelise võrdluskatsega (3).

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

11. Tavalised laboriseadmed ja:

a) 250–300 ml suurused klaaskorgiga bioloogilise hapnikutarbe (BHT-) pudelid või võib kasutada klaaskorgiga kitsakaelalisi 250 ml suuruseid pudeleid;

b) mitu 2-, 3- ja 4-liitrist pudelit liitrimärkidega katse ettevalmistamiseks ja BHT-pudelite täitmiseks;

c) vesivann või püsiva temperatuuriga ruum pudelite hoidmiseks ühtlasel temperatuuril (± 1 °C) pimedas;

d) seadmed lahustunud hapniku määramiseks;

e) membraanfiltrid 0,2–0,45 μm (soovi korral);

f) varustus konkreetse kemikaali määramiseks (soovi korral).

Merevesi

12. Merevee proov võetakse hoolikalt puhastatud nõusse ja transporditakse laborisse eelistatavalt ühe või kahe päeva jooksul pärast võtmist. Transpordi ajal ei tohi proovi temperatuur tõusta oluliselt kõrgemale katses kasutatavast temperatuurist.

▼**M6**

13. Registreeritakse täpne proovivõtu koht ja kirjeldatakse merevee saasteainete ja toitainete sisaldust kõnealuses kohas. Eriti rannikulähedaste või saastatud vete puhul esitatakse selles kirjelduses ka heterotroofsete mikroorganismide kolooniate arv, samuti lahustunud nitraadi, ammooniumi ja fosfaadi kontsentratsioon.

14. Merevee proovi enda kohta esitatakse järgmine teave:

— võtmise kuupäev;

— proovivõtu sügavus;

— proovi välimus – sogane vms;

— temperatuur proovi võtmise ajal;

— soolsus;

— lahustunud orgaaniline süsinik (DOC);

— ajavahemik proovivõtust kuni katseni.

15. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus proovis on kõrge või kui arvatakse, et tühikatse bioloogiline hapnikutarve (BHT) 28 päeva pärast on rohkem kui 30 protsenti võrdlusainete omast, siis soovitatakse merevett enne kasutamist umbes üks nädal vanandada.

16. Mereveeproovi vanandatakse hoides seda aeroobsetes tingimustes katse temperatuuril ja pimeduses või hajunud valguses. Vajaduse korral tuleb aeroobsete tingimuste säilitamiseks kergelt aereerida. Vanandamise ajal väheneb kergesti biolagundatava orgaanilise materjali sisaldus. Laboritevahelises võrdluskatses (3) ei leitud vanandatud ja värskelt võetud mereveeproovide biolagundamise võimes mingeid erinevusi.

17. Enne kasutamist töödeldakse merevett suuremate osakeste eemaldamiseks näiteks filtrimisega läbi nailonfiltri või jämeda paberfiltri (mitte kasutada membraan- või klaasmikrokiud- (GF/C-)filtrit) või setitamise ja dekanteerimisega. Katseprotokollis kirjeldatakse kasutatud meetodit. Eeltöötlemine tehakse pärast vanandamist, kui seda kasutatakse.

Mineraaltoitainete põhilahused

18. Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.

a)	kaaliumdivesinikortofosfaat, KH_2PO_4	8,50 g
	dikaaliumvesinikortofosfaat, K_2HPO_4	21,75 g
	dinaatriumvesinikortofosfaatdihüdraat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	ammooniumkloriid, NH_4Cl	0,50 g
	lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.	
b)	kaltsiumkloriid, $CaCl_2$	27,50 g
	lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.	
c)	magneesiumsulfaatheptahüdraat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.	
d)	raud(III)kloriidheksahüdraat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.	

▼M6

Sadenemist lahuses d saab ära hoida ühe tilga kontsentreeritud soolhappe või 0,4 g etüleendiamiintetraäädikhappe (EDTA dinaatriumsool) lisamisega 1 liitri lahuse kohta. Kui põhilahuses tekib sade, asendatakse see värskelt valmistatud lahusega.

Uuritava keskkonna valmistamine

19. Eeltöödeldud merevee ühe liitri kohta lisatakse 1 ml kumbagi eespool kirjeldatud põhilahust. Katsekeskkond küllastatakse katse temperatuuril õhuga; selleks aereeritakse seda puhta suruõhuga umbes 20 minutit. Kontrollimiseks määratakse lahustunud hapniku kontsentratsioon. Lahustunud hapniku küllastuskontsentratsiooni eri temperatuuride ja soolsuse juures võib lugeda käesolevale katsemeetodile lisatud nomogrammilt (4. liide).

Inokulum

20. Merevees juba olemasolevatele mikroorganismidele ei lisata spetsiaalset inokulumi. Mereveest saadud katsekeskkonnas (ja soovitatavalt ka esialgses merevee proovis) määratakse (soovi korral) kolooniat moodustavate heterotroofsete bakterite arv, näiteks kolooniate loendamisega mereveeagari plaadil. See on eriti soovitatav proovide puhul, mis on võetud rannikuveest või saastatud merealalt. Heterotroofsete mikroobide aktiivsust kontrollitakse nii, et katse tehakse võrdlusainega.

Katsepudelite ettevalmistamine

21. Kõik merevee ettevalmistamise toimingud, sealhulgas vanandamine ja eeltöötlemine tehakse valitud temperatuuril vahemikus 15–20 °C; kõik klaasnõud peavad olema puhtad, kuid mitte steriilsed.

22. Uuritava aine ja võrdlusaine BHT uurimiseks üheaegsetes katseseeriates valmistatakse ette BHT-pudelite rühmad. Kõik analüüsid (tühikatsed, võrdlusaine ja uuritav aine) tehakse kahe paralleelina, st iga määramise jaoks valmistatakse ette kaks pudelit. Analüüsid tehakse vähemalt päevadel 0, 5, 15 ja 28 (neli määramist). Hapnikuanalüüside puhul on nelja määramise jaoks vaja kokku $3 \times 2 \times 4 = 24$ pudelit (tühikatse, võrdlusaine ja uuritav aine), seega ligikaudu 8 liitrit katsekeskkonda (uuritava aine ühe kontsentratsiooni jaoks).

23. Valmistatakse eraldi uuritava aine ja võrdlusainete lahused suurtes piisava mahuga pudelites (punkt 11); esimesena lisatakse uuritav aine või võrdlusaine kas otse või kontsentreeritud põhilahusena suurde pudelisse, mis on osaliselt täidetud. Lisatakse muud katsekeskkonna komponendid nii, et saadakse lõplikus katsekeskkonnas vajalik kontsentratsioon. Kui kasutatakse uuritava kemikaali ja/või võrdluskemikaali põhilahuseid, tuleb tagada, et merevee soolsus katsekeskkonnas oluliselt ei muutuks.

24. Uuritava aine ja võrdlusaine kontsentratsioonide valimisel võetakse arvesse järgmist:

a) hapniku lahustuvus merevees katse põhilise temperatuuri ja soolsuse juures (vt lisatud nomogramm, 4. liide);

b) mereveega tehtava tühikatse BHT; ning

c) uuritava aine eeldatav biolagundatavus.

▼M6

25. 15 °C ja 20 °C ning ookeanivee soolsuse 32/1 000 juures on hapniku lahustuvus vees vastavalt ligikaudu 8,1 ja 7,4 mg/l. Merevee enda hapnikutarbimine (tühikatse hapnikutarve) võib olla 2 mg O_2/l või suurem, kui merevett ei ole vanandatud. Selleks et tagada märkimisväärne hapnikusisaldus pärast uuritava aine oksüdeerimist, tuleks kasutada uuritava aine algkontsentratsiooni ligikaudu 2–3 mg/l (sõltuvalt THTst) selliste ainete puhul, mis eeldatavasti lagunevad katse tingimustes täielikult (nagu näiteks võrdlusained). Halvemini lagundatava aine puhul kasutatakse kõrgemat kontsentratsiooni, kuni ligikaudu 10 mg/l, kui ainel ei ole mürgist mõju. Kasulik võib olla teha paralleelselt katsed uuritava aine madala (ligikaudu 2 mg/l) ja kõrge (ligikaudu 10 mg/l) kontsentratsiooniga.

26. Paralleelselt tuleb teha hapniku tühikatse; pudelitesse ei lisata sel juhul ei uuritavat ainet ega võrdlusainet.

27. Kui määratakse inhibeerivat toimet, valmistatakse eraldi järgmised lahused suurtes pudelites (punkt 13):

a) 2 mg/l kergesti lagunevat ainet, see tähendab ühte eespool nimetatud võrdlusainetest;

b) x mg/l uuritavat ainet (tavaliselt x = 2);

c) 2 mg/l kergesti lagunevat ainet pluss x mg/l uuritavat ainet.

Füüsikalis-keemiline kontrollkatse (soovi korral)

28. Kui kasutatakse spetsiifiliste analüüside võimalust, võib teha füüsikalis-keemilise katse, et kontrollida uuritava aine võimalikku kõrvaldamist mõne abiootilise mehhanismi kaudu, näiteks hüdrolüüsi või adsorptsiooniga. Füüsikalis-keemilise kontrollkatse võib teha elavhõbe(II)kloriidi ($HgCl_2$) ([1]) lisamisega (50–100 mg/l) uuritava aine lahusega paralleelkatsetesse, et peatada mikroobide tegevus. Kui konkreetse aine kontsentratsioon kontrollkatses oluliselt väheneb, osutab see abiootiliste kõrvaldamismehhanismide mõjule.

BHT-pudelite arv tüüpilises katses

29. Tüüpilises katses kasutatakse järgmisi pudeleid:

— vähemalt 8 pudelit uuritava ainega;

— vähemalt 8 pudelit, mis sisaldavad üksnes merevett, millele on lisatud toitained;

— vähemalt 8 pudelit võrdlusainega ja vajaduse korral

— 6 pudelit, mis sisaldavad uuritavat ainet ja võrdlusainet (mürgisuse kontrollkatse).

KATSE KÄIK

30. Kohe pärast lahuste valmistamist viiakse sifoon iga lahust sisaldava suure pudeli alumisse veerandisse (mitte põhja) ja täidetakse kõik vastava rühma BHT-pudelid. Viivitamata määratakse 0-kontrollis (aeg = 0) lahustunud hapnik (punkt 33) või konserveeritakse need hilisemaks keemiliseks analüüsiks $MnCl_2$ (mangaan(II)kloriidi) ja NaOH (naatriumhüdroksiidi) abil sadestamisega.

([1]) Elavhõbe(II)kloriid ($HgCl_2$) on väga mürgine aine, mille käsitsemisel tuleb järgida vajalikke ohutuseeskirju. Kõnealuse kemikaali vesilahused tuleks kõrvaldada ettenähtud korras; neid ei tohi lasta otse kanalisatsioonisüsteemi.

▼M6

31. Ülejäänud BHT-pudelite paralleele inkubeeritakse katse temperatuuril (15–20 °C) pimedas ja võetakse need inkubeerimiskambrist sobivate ajavahemike järel (nt vähemalt 5, 15 ja 28 päeva pärast) ja määratakse nendes lahustunud hapnik (punkt 33).

32. Konkreetse aine määramiseks (soovi korral) filtritakse proovid läbi membraanfiltri (0,2–0,45 μm) või tsentrifuugitakse 15 minutit. Vajaduse korral säilitatakse filtritud või tsentrifuugitud proove 2–4 °C juures kuni 48 tundi või allpool – 18 °C pikemat aega (kui on teada, et see ei mõjuta ainet, viiakse pH enne säilitamist 2 juurde).

Lahustunud hapniku määramine

33. Lahustunud hapniku kontsentratsioon määratakse riigi või rahvusvahelisel tasandil tunnustatud keemilise või elektrokeemilise meetodiga.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

34. Analüüsi tulemused salvestatakse andmelehtedel (vt 5. liide).

35. Bioloogiline hapnikutarve (BHT) arvutatakse tühikatse hapnikukao ja uuritava aine lahuse hapnikukao vahena katse tingimustes. Netohapnikukadu jagatakse uuritava aine kontsentratsiooniga (mass/maht), et leida BHT (mg) uuritava aine mg kohta. Lagunemine avaldatakse suhtarvuna: bioloogilise hapnikutarbe suhe teoreetilisse hapnikutarbesse (THT; eelistatav) või keemilisse hapnikutarbesse (KHT) protsentides (vt punkt 36).

36. Arvutatakse biolagunemise väärtused igal proovide võtmise ajal nii uuritava aine kui ka võrdlusaine puhul, kasutades ühte järgmistest võrranditest:

$$biolagunemise\% = \frac{mg\ O_2/mguuritavat\ ainet}{mg\ THT/mguuritavat\ ainet} \times 100$$

$$biolagunemise\% = \frac{mg\ O_2/mguuritavat\ ainet}{mg\ KHT/mguuritavat\ ainet} \times 100$$

kus:

THT = teoreetiline hapnikutarve (arvutamine, vt 3. liide);

KHT = keemiline hapnikutarve, mis määratakse katseliselt.

Märkus: Mõnel juhul ei anna need kaks arvutamismeetodit (protsent teoreetilise või protsent keemilise hapnikutarbe järgi) sama tulemust; parem on kasutada teoreetilist hapnikutarvet, kuna keemilise hapnikutarbe määramise katses ei oksüdeerita mõnda ainet lõpuni.

37. Lagunemiskatse käik esitatakse graafiliselt (vt näide punktis „Tulemuste nõuetekohasus ja tõlgendamine”. Kui tulemusi on piisavalt, arvutatakse biolagunemise kõverast ootefaas (t_L) ja aeg, mis kulub ootefaasi lõpust kuni 50 % biolagunemise saavutamiseni (t_{50}).

38. Kui kasutatakse spetsiifilist analüüsi (soovi korral), siis teatatakse konkreetse aine primaarse lagunemise protsent katseaja jooksul (pärast analüüsi tühikatseid arvestavate parandite tegemist).

▼M6

Katseprotokoll

39. Katseprotokollis tuleb esitada järgmine teave:

Uuritav aine:

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— identifitseerimisandmed.

Katsetingimused:

— proovivõtu koht ja selle kirjeldus; merevee saastatus (kolooniate arv) ja toitainete (nitraat, ammoonium, fosfaat, kui see on asjakohane) sisaldus;

— proovi iseloomustavad andmed (proovivõtu kuupäev, sügavus, proovi välimus, temperatuur, soolsus, lahustunud orgaaniline süsinik (soovi korral), proovi võtmise ja katses kasutamise vaheline ajavahemik);

— meetod, mida kasutati merevee vanandamiseks (kui vanandati);

— meetod, mida kasutati merevee eeltöötluseks (filtrimine/sedimentatsioon);

— KHT määramisel kasutatud meetod (kui määrati);

— hapniku mõõtmise meetod;

— dispergeerimismeetod, mida kasutati katsetingimustes halvasti lahustuva aine puhul;

— meetod, mida kasutati merevee heterotroofide arvu määramiseks (plaadil loendamise meetod või muu meetod);

— meetod, mida kasutati merevee lahustunud orgaanilise süsiniku määramiseks (soovi korral);

— spetsiifilise analüüsi meetod (soovi korral);

— muud meetodid merevee iseloomustamiseks (ATP mõõtmine jne) (soovi korral).

Tulemused:

— analüüsiandmed esitatuna andmelehel (vt 5. liide);

— lagunemise käik graafikuna diagrammil, mis näitab ootefaasi (t_L), tõusu ja aega (alates ootefaasi lõpust), mis kulub uuritava aine oksüdeerumiseks kulutatud lõplikust hapnikutarbest 50 % saavutamiseks (t_{50}). Ootefaasi pikkuse võib hinnata graafiliselt, nagu on näidatud juuresoleval joonisel; mugav on võtta ootefaasiks aeg, mis kulub 10 % lagunemiseks;

— lagunemise protsent pärast 28 päeva möödumist.

Tulemuste arutelu.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine

40. Tühikatse hingamine ei tohiks ületada 30 % katsepudelis olevast hapnikust. Kui selle kriteeriumi täitmine värske mereveeproovi puhul ei ole võimalik, peab merevesi olema enne kasutamist vanandatud (stabiliseeritud).

41. Arvesse tuleb võtta võimalust, et lämmastikku sisaldavad ained võivad mõjutada katse tulemusi.

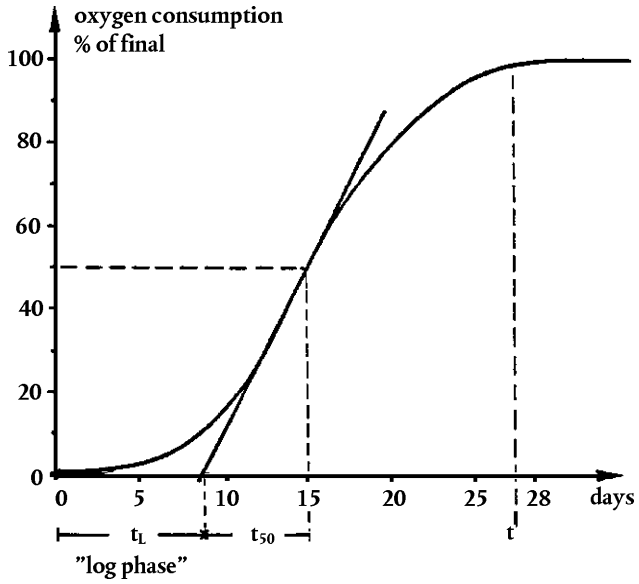
▼M6

42. Võrdlusainetega nagu naatriumbensoaat ja aniliin saadud tulemused peaksid olema võrreldavad tulemustega, mis saadi laboritevahelises võrdluskatses (3) (vt punkt 9). Kui võrdlusainetega saadud tulemused on ebatüüpilised, tuleb katset korrata muu mereveeprooviga.

43. Uuritavat ainet võib pidada bakterite elutegevust katse kontsentratsioonil pärssivaks, kui võrdlusaine ja uuritava aine segu lahuse BHT on väiksem kui kummagi aine lahuse BHT väärtuste summa.

44. Kuna uuritava aine kontsentratsioon katses on suhteliselt suur võrreldes enamiku looduses esinevate kontsentratsioonidega ja seega on uuritava aine ja muude süsinikuallikate suhtarv ebasoodne, peetakse seda meetodit eelkatseks, mis näitab, kas aine on kergesti biolagunduv või mitte. Sellest tulenevalt ei tähenda madal katsetulemus tingimata seda, et aine ei ole merevees biolagunev; see näitab, et biolagundatavuse kindlakstegemiseks on vaja teha rohkem uuringuid.

Järgmisel joonisel on esitatud biolagunemiskatse teoreetiline kõver, mis näitab, kuidas saab hinnata ootefaasi (*lag phase*) pikkust t_L ja ajavahemikku t_{50}, mis algab ajahetkest t_L ja on vajalik uuritava aine 50 % oksüdeerimiseks.



KIRJANDUS

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) Käesoleva lisa peatükk C.4-B. Kohese biolagunduvuse määramine. III osa. Muudetud OECD sõelkatse

(3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.

(4) Käesoleva lisa peatükk B.11. Biodegradatsioon. Aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse.

(5) Käesoleva lisa peatükk C.4-E. Kohese biolagunduvuse määramine. VI osa. Kinnise pudeli katse.

▼M6

1. liide

Orgaanilise süsiniku määramine merevees

LOKSUTATAVA KOLVI MEETOD

Orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks veeproovis oksüdeeritakse proovi orgaanilised ühendid süsinikdioksiidiks, kasutades üldiselt ühte järgmisest kolmest meetodist:

— märgoksüdatsioon persulfaadi/UV-kiirgusega;

— märgoksüdatsioon persulfaadi/kõrge temperatuuriga (116–130 °C);

— põletamine.

Tekkiva CO_2 kogus mõõdetakse neeldumise järgi infrapunaspektris või titrimeetriliselt. Teine võimalus on taandada CO_2 metaaniks, mille kogus mõõdetakse leekionisatsioondetektoriga.

Persulfaadi/UV-meetodit kasutatakse tavaliselt puhtama vee analüüsimiseks, milles on vähe tahkeid osakesi. Viimaseid kahte meetodit võib kasutada enamiku veeproovitüüpide puhul, kusjuures persulfaadi/kõrge temperatuuri oksüdatsiooni meetod on kõige sobivam madala süsinikusisaldusega proovide puhul ja põletamismeetodit saab kasutada proovide jaoks, milles lendumatu orgaanilise süsiniku sisaldus ületab oluliselt 1 mg C/l.

Segavad tegurid

Kõik kolm meetodit sõltuvad proovis sisalduva anorgaanilise süsiniku kõrvaldamisest või arvessevõtmisest. CO_2 väljapuhumine hapestatud proovist on kõige sagedamini kasutatav meetod anorgaanilise süsiniku kõrvaldamiseks, kuigi sellega lähevad kaotsi ka lenduvad orgaanilised ühendid (1). Anorgaanilise süsiniku täielik kõrvaldamine või arvessevõtmine tuleb tagada proovi igasuguse koostise puhul ja olenevalt proovi tüübist tuleb lisaks mittelenduvatele orgaanilistele süsinikuühenditele määrata ka lenduvad orgaanilised süsinikuühendid.

Suure kloriidisisalduse puhul väheneb persulfaadi/UV-meetodiga oksüdeerimise tõhusus (2). Elavhõbe(II)nitraadiga modifitseeritud oksüdeeriva reagendi lisamisega saab selle segava toime siiski kõrvaldada. Igasuguste kloriidi sisaldavate proovide puhul soovitatakse kasutada suurimat lubatavat proovi mahtu. Põletamismeetodi kasutamisel võib proovi suur soolasisaldus põhjustada soolakihi tekkimist katalüsaatori pinnale ja põletustoru ulatuslikku korrosiooni. Vastavalt tootja juhendile tuleb sel juhul võtta vajalikud ettevaatusabinõud.

Väga häguse proovi ja tahkeid osakesi sisaldava proovi puhul võib oksüdeerimine persulfaadi/UV-meetodiga jääda ebatäielikuks.

Näide sobiva meetodi kohta

Lendumatud orgaanilised süsinikuühendid määratakse persulfaadi/UV-kiirgusega oksüdeerimisega ja tekkinud CO_2 mõõtmisega mittelahutava infrapunaspektromeetria abil.

Oksüdeerimisreagenti muudetakse vastavalt ettepanekutele (2), mida on kirjeldatud tootja käsiraamatus:

a) 8,2 g $HgCl_2$ ja 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ lahustatakse mitmesajas milliliitris madala süsinikusisaldusega analüütilise puhtusastmega vees;

b) elavhõbedasoola lahuses lahustatakse 20 g $K_2S_2O_8$;

▼**M6**

c) segule lisatakse 5 ml kontsentreeritud HNO_3;

d) reagent lahjendatakse 1 000 ml-ni.

Kloriidi segav mõju kõrvaldatakse sellega, et 10 % kloriidisisalduse puhul võetakse proovi mahuks 40 µl ja 1,9 % kloriidisisalduse puhul 200 µl. Suure kloriidisisaldusega või suure mahuga proove võib selle meetodiga analüüsida siis, kui hoitakse ära kloriidi kogunemine oksüdatsiooninõusse. Lenduva orgaanilise süsiniku määramise võib teha hiljem, kui see on kõnealuse proovitüübi puhul asjakohane.

KIRJANDUS

(1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Samuti pakub huvi (seoses automatiseeritud analüüsisüsteemi kirjeldusega):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼**M6**

2. liide

Biolagundatavus merevees

LOKSUTATAVA KOLVI MEETOD

ANDMELEHT

1 **LABOR:**

2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV:**

3. **UURITAV AINE:**

Nimetus:

Põhilahuse kontsentratsioon:	mg/l ainena
Algkontsentratsioon keskkonnas, t_o:	mg/l ainena
	mg lah. org. C/l

4. **MEREVESI:**

Allikas:

Proovivõtu kuupäev:

Proovivõtu sügavus:

Välimus proovi võtmise ajal (nt hägune jne):

Soolsus proovi võtmise ajal:	‰
Temperatuur proovi võtmise ajal:	°C
Lahustunud orgaaniline süsinik x tundi pärast proovi võtmist:	mg/l

Eeltöötlus enne katse tegemist (nt filtrimine, setitamine, vanandamine jne):

Mikroobikolooniate arv	— originaalproovis:	kolooniat/ml
	— katse alguses:	kolooniat/ml

Muud omadused:

5. **SÜSINIKU MÄÄRAMINE:**

Süsinikuanalüsaator:

	Kolb nr		Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC) n päeva möödumisel (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Katse: uuritavat ainet sisaldav lisatud toitainetega merevesi	1	a_1					
		a_2					
		keskmine, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		keskmine, $C_{d(t)}$					

▼**M6**

	Kolb nr		Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC) n päeva möödumisel (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Tühikatse: lisatud toitainetega merevesi ilma uuritava aineta	1	c_1					
		c_2					
		keskmine, $C_{d(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		keskmine, $C_{b(t)}$					
	keskmine$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE:**

Kolb nr	Tulemuste arvutamine	Lagunemisprotsent n päeva pärast				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Keskmine (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) D_1 ja D_2 ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

Märkus: analoogseid tabeleid võib kasutada ka siis, kui lagunemist jälgitakse konkreetse aine analüüsiga, samuti võrdlusaine ja mürgisuse kontrollkatsete puhul.

7. **ABIOOTILISE LAGUNEMISE KATSE (pole kohustuslik)**

	Aeg (päevad)	
	0	t
Lahust. org. süsiniku konts. steriilses kontrollkatses (mg/l)	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\textit{abiootilise lagunemise\%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

3. liide

Teoreetilise biokeemilise hapnikutarbe arvutamine

KINNISE PUDELI MEETOD

Aine $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ puhul, mille molekulmass on MW, arvutatakse THT järgmiselt:

$$THT_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Selles arvutuses on eeldatud, et C mineraliseritakse CO_2-ks, H – H_2O-ks, P – P_2O_5-ks ja Na – Na_2O-ks. Halogeen kõrvaldatakse vesinikhaliidina ja lämmastik ammoniaagina.

Näide:

Glükoos $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$THT = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 mg\ O_2/mg glükoosi$$

Muude kui leelismetallide soolade molekulmasside arvutamisel eeldatakse, et soolad on hüdrolüüsunud.

Väävli puhul eeldatakse oksüdeerumist kuni oksüdatsiooniastmeni + 6.

Näide:

Naatrium-*n*-dodetsüülbenseensulfonaat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$THT = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 mg\ O_2/mg ainet$$

Lämmastikku sisaldavate ainete puhul võib lämmastik muutuda ammoniaagiks, nitrititeks, nitraatideks; iga selline võimalus tähendab erinevat teoreetilist biokeemilist hapnikutarvet.

$$THT_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$THT_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

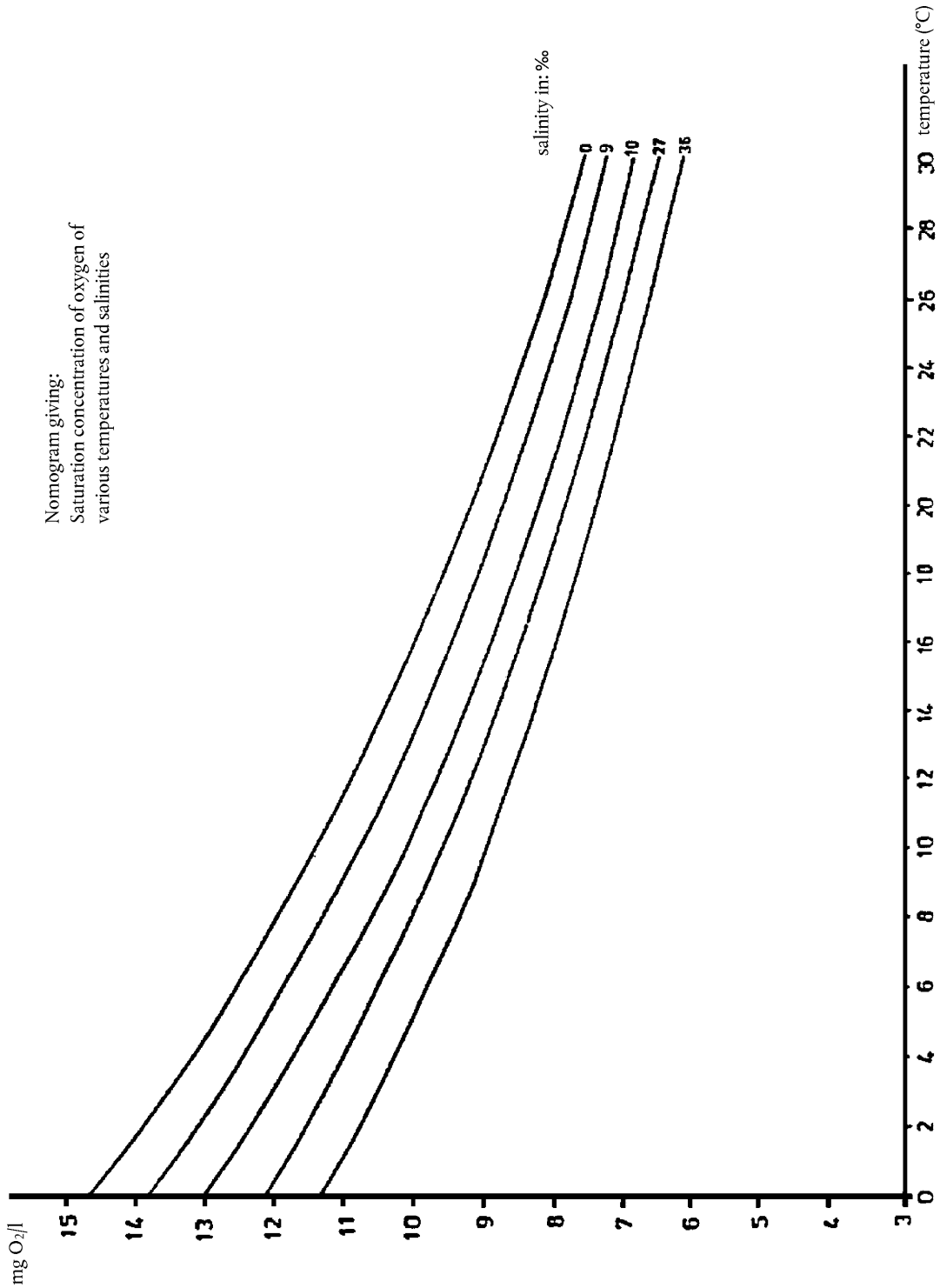
Oletame sekundaarse amiini puhul täielikku muundumist nitraadiks:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$THT_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 mg\ O_2/mg ainet$$

▼**M6**

4. liide


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of various temperatures and salinities
salinity in: ‰
0
9
10
27
36
mg O2/l
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
temperature (°C)

▼M6

5. liide

Biolagundatavus merevees

KINNISE PUDELI MEETOD

ANDMELEHT

1. **LABOR:**

2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV:**

3. **UURITAV AINE:**

Nimetus:

Põhilahuse kontsentratsioon:	mg/l
Lähtekontsentratsioon mereveekeskkonnas:	mg/l
THT või KHT:	mg O_2 uuritava aine mg kohta

4. **MEREVESI:**

Allikas:

Proovivõtu kuupäev:

Proovivõtu sügavus;

Välimus proovi võtmise ajal (nt hägune jne):

Soolsus proovi võtmise ajal:	‰
Temperatuur proovi võtmise ajal:	°C
Lahust. org. süsinik x tundi pärast proovi võtmist:	mg/l

Eeltöötlus enne katse tegemist (nt filtrimine, setitamine, vanandamine jne):

Mikroobikolooniate arv	— originaalproovis:	kolooniat/ml
	— katse alguses:	kolooniat/ml

Muud omadused:

5. **KATSEKESKKOND:**

Temperatuur pärast aereerimist:	°C
O_2 kontsentratsioon pärast aereerimist ja seismist enne katse algust:	mg O_2/l

6. **LAHUSTUNUD HAPNIKU MÄÄRAMINE:**

Meetod: Winkler/elektrood

	Kolb nr		mg O_2/l pärast n päeva			
			0	5	15	28
Katse: uuritavat ainet sisaldav toitainetega merevesi	1	a_1				
	2	a_2				
	Katsete keskmine	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Kolb nr		mg O_2/l pärast n päeva			
			0	5	15	28
Tühikatse: ilma uuritava aineta toitainetega merevesi	1	c_1				
	2	c_2				
	Tühikatsete keskmine	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Märkus: Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollkatsete jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

7. **LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE: LAGUNEMISPROTSENT (%D)**

	Lagunemisprotsent n päeva pärast		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (1)			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{uuritav\ aine(mg/l) \times THT} \times 100$			

(1) Sellega eeldatakse, et $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, kus
$m_{b(o)}$ = tühikatse väärtus päeval 0,
$m_{t(o)}$ = uuritava aine väärtus päeval 0.
Kui $m_{b(o)}$ ei ole võrdne $m_{t(o)}$-ga, siis kasutatakse $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, kus
$m_{b(x)}$ = tühikatse väärtus päeval x,
$m_{t(x)}$ = uuritava aine väärtus päeval x.

▼M6

C.43. ORGAANILISTE AINETE ANAEROOBNE BIOLAGUNEVUS LÄBIKÄÄRINUD MUDAS: MÕÕTMINE GAASI ERALDUMISE JÄRGI

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 311 (2006). Orgaaniliste ainete biolagunevuse hindamiseks aeroobsetes tingimustes on mitmeid sõelkatsemeetodeid (katsemeetodid C.4, C.9, C.10 ja C.11 (1) ning OECD katsejuhend nr 302C (2)) ja nendega saadud tulemusi on edukalt kasutatud selleks, et ennustada ainete käitumist aeroobses keskkonnas, eriti reovee aeroobse töötlemise staadiumides. Ka vees lahustumatuid aineid, samuti reovee tahketele osakestele adsorbeeruvaid aineid töödeldakse aeroobsetes tingimustes, kuna need jäävad setitatud reovette. Kuid suurem osa sellistest ainetest on seotud reovee esmase settinud mudaga, mis eraldatakse töötlemata reoveest settimistankides enne, kui setitatud reovett ehk supernatanti hakatakse töötlema aeroobsetes tingimustes. Muda, mis osakestevahelises vedelikus sisaldab mõnevõrra ka lahustuvaid aineid, suunatakse seejärel kuumutatavatesse kääritamisnõudesse anaeroobsele töötlemisele. Seni ei ole veel meetodeid anaeroobse biolagundatavuse hindamiseks anaeroobse kääritamise nõudes ja käesoleva katse eesmärk on täita see lünk; see meetod ei tarvitse olla kasutatav muudes hapnikuvabades keskkonnaosades.

2. Anaeroobse biolagunduvuse hindamiseks on edukalt kasutatud respiromeetrilisi meetodeid, millega mõõdetakse vabanevate gaaside, peamiselt metaani (CH_4) ja süsinikdioksiidi (CO_2) koguseid. Birch *et al* (3) on need meetodid läbi vaadanud ja teinud järelduse, et sellel alal on kõige põhjalikum Sheltoni ja Tiedje (4) töö, mis põhineb varasematel töödel (5, 6, 7). Nende meetodis (4), mida hiljem arendasid edasi teised (8) ja mis on saanud Ameerika Ühendriikides standardmeetodiks (9, 10), ei lahendatud raskusi, mis on seotud CO_2 ja CH_4 erineva lahustumisega katsekeskkonnas ning uuritava aine poolt vabastatava gaaside koguse teoreetilise arvutamisega. ECETOCi aruandes (3) soovitati lahustunud anorgaanilise süsiniku täiendavat mõõtmist supernatandis, tänu millele sai meetodit laiemalt kasutada. ECETOCi meetodiga tehti rahvusvaheline laboritevaheline võrdluskatse (nn kaliibrimine) ja sellest sai ISO standard ISO 11734 (11).

3. Käesolevas katsemeetodis, mis põhineb standardil ISO 11734 (11), kirjeldatakse sõelkatsemeetodit, millega hinnatakse orgaaniliste ainete potentsiaalset anaeroobset biolagunevust konkreetsetes tingimustes (st anaeroobses sette kääritamistankis teatava aja jooksul ja mikroorganismide teatava kontsentratsiooni juures). Kuna kasutatakse lahjendatud reoveesetet, milles uuritava aine kontsentratsioon on suhteliselt kõrge ja katse kestab tavaliselt kauem kui reovee anaeroobne kääritamine, ei tarvitse katse tingimused tingimata olla samad kui anaeroobses kääritamistankis; samuti ei saa sellega hinnata orgaaniliste ainete biolagunevust muudes erinevates keskkonnatingimustes. Mudal lastakse uuritava ainega kokkupuutes olla kuni 60 päeva; see on pikem aeg kui tavalisel reoveemuda anaeroobsel kääritamisel (25-30 päeva), kuid mõne tehase reoveepuhastis võib muda olla ka hoopis kauem. Käesoleva katse tulemused ei võimalda teha sama põhjendatud ennustusi kui aeroobse biolagunemise katse puhul, kuna uuritavate ainete kohta „kiiretes” aeroobsetes katsetes, modelleerimiskatsetes ja aeroobses keskkonnas saadud andmed on piisavad selleks, et olla veendunud seose olemasolus; anaeroobse keskkonna koha on sarnaseid andmeid väga vähe. Täielikku anaeroobset biolagunemist võib oletada juhul, kui eraldub 75–80 % teoreetiliselt võimalikust gaasikogusest. Uuritava aine ja biomassi

▼M6

kõrge suhtarv, mida kasutati kõnealustes katsetes, tähendab seda, et katse edukalt läbinud aine tõenäoliselt laguneb anaeroobses kääritamistankis. Aine, mida ei õnnestu gaasiks muuta, ei tarvitse siiski olla püsiv keskkonna seisukohast realistlikuma aine-biomassi suhtarvu juures. Toimuvad ka muud anaeroobsed reaktsioonid, näiteks dekloorimine, mille tulemusel võib aine vähemalt osaliselt laguneda, kuid käesoleva katsega selliseid reaktsioone ei tuvastata. Kui kasutada aga uuritava aine määramiseks spetsiifilisi analüüsimeetodeid, saab aine kadumist siiski jälgida (vt punktid 6, 30, 44 ja 53).

KATSE PÕHIMÕTE

4. Pestud läbikäärinud muda ([1]), mis sisaldab madalas kontsentratsioonis (< 10 mg/l) anorgaanilist süsinikku, lahjendatakse umbes kümme korda, nii et tahke aine üldsisaldus on 1–3 g/l, ja inkubeeritakse 35 ± 2 °C juures suletud anumas uuritava aine kontsentratsiooni 20–100 mg C/l juures kuni 60 päeva. Nähakse ette muda aktiivsuse mõõtmine, milleks tehakse paralleelselt tühikatse keskkonnas, millesse on viidud muda inokulum, kuid mis ei sisalda uuritavat ainet.

5. Mõõdetakse rõhu suurenemist anuma vabaruumis, mille põhjuseks on CO_2 ja metaani tekkimine. Suur osa tekkinud CO_2-st jääb lahustununa vedelfaasi või muutub katse tingimustes karbonaadiks või vesinikkarbonaadiks. Katse lõpus mõõdetakse tekkinud anorgaanilise süsiniku sisaldus.

6. Süsiniku kogus (anorgaaniline + metaan), mis tekib uuritava aine biolagunemisel, arvutatakse gaasi vabanemisest ja anorgaanilise süsiniku kogusest vedelfaasis, millest on lahutatud tühikatse vastavad näitajad. Biolagunemise määr arvutatakse tekkinud anorgaanilise süsiniku ja metaanis oleva süsiniku protsendina uuritavas aines olnud süsiniku mõõdetud või arvutatud kogusest. Biolagunemise käiku saab jälgida üksnes tekkinud gaasi vahepealsete mõõtmistega. Lisaks sellele võib primaarse biolagunemise määrata konkreetse aine määramisega katse alguses ja lõpus.

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

7. Tulemuste õigesti tõlgendamiseks on vaja teada uuritava aine puhtust, vees lahustuvust, lenduvus- ja adsorptsiooniomadusi. Uuritava kemikaali orgaanilise süsiniku sisaldus (massiprotsent) peab olema teada kas selle keemilise struktuuri põhjal või mõõtmise teel. Lenduva uuritava aine puhul aitab mõõdetud või arvutatud Henry seaduse konstant otsustada, kas see katse on kohaldatav. Sobiva uuritava kontsentratsiooni valimiseks ning halba biolagunduvust näitavate tulemuste tõlgendamiseks on kasulik omada teavet uuritava aine mürgisuse kohta anaeroobsete bakterite suhtes. Soovitatav on moodustada katses kontrollrühm ka pärssimise kontrollimiseks, välja arvatud juhul kui on on teada, et uuritav aine ei pärsi anaeroobsete mikroobide tegevust (vt punkt 21 ja ISO 13641-1 (12)).

([1]) Läbikääritatud reoveemuda on reovee ja aktiivmuda sadestunud faaside segu, mida on inkubeeritud anaeroobses kääritustankis ligikaudu 35 °C juures, et vähendada biomassi kogust ja haisuprobleeme ning parandada vee eraldatavust mudast. See koosneb anaeroobse käärimise bakteritest ja metanogeensetest bakteritest, kes toodavad süsinikdioksiidi ja metaani (11).

▼M6

KATSEMEETODI KASUTATAVUS

8. Meetodit võib rakendada vees lahustuvate ainete puhul; seda võib rakendada ka halvasti lahustuvate või lahustumatute ainete korral eeldusel, et kasutatakse täpse doseerimise meetodit, näiteks vt ISO 10634 (13). Üldiselt tuleb iga lenduva aine puhul teha otsus eraldi. Võib-olla on vaja kasutada erimeetmeid, näiteks mitte lasta gaasi katse ajal välja.

VÕRDLUSAINED

9. Katse läbiviimise kontrollimiseks tehakse katse võrdluskemikaaliga; selleks pannakse osana tavapärasest katsest käima ka sobivad anumad võrdlusainega. Fenool, naatriumbensoaat ja polüetüleenglükool 400 on näiteks ühendid, millest teoreetilise gaaside (metaani ja anorgaanilise süsiniku) vabanemise järgi peaks 60 päevaga lagunema üle 60 % (3, 14).

KATSETULEMUSTE KORRATAVUS

10. Rahvusvahelises võrdluskatses (14) oli kolme paralleelkatse korratavus gaasi rõhu mõõtmiste järgi hea. Suhteline standardhälve (variatsioonikordaja, COV) oli üldiselt alla 20 %, kuigi sageli tõusis see väärtus üle 20 % mürgise aine juuresolekul või 60-päevase inkubatsiooniperioodi lõpus. Suuremaid kõrvalekaldeid esines ka nõudes, mille maht oli alla 150 ml. Katsekeskkonna pH oli katse lõpus vahemikus 6,5–7,0.

11. Laboritevahelises võrdluskatses saadi järgmised tulemused.

Uuritav aine	Andmeid kokku n_1	Keskmine lagunemine (kõigist andmetest) (%)	Suhteline standardhälve (kõigist andmetest) (%)	Nõuetekohaseid andmeid n_2	Keskmine lagunemine (nõuetekohastest andmetest) (%)	Suhteline standardhälve (nõuetekohastest andmetest) (%)	Andmeid lagunemisprotsendiga > 60 % nõuetekohastes katsetes n_3
Palmitiinhape	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polüetüleenglükool 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Osa n_2-st.

12. Kõigist palmitiinhappe ja polüetüleenglükool 400 tulemustest leitud keskväärtuse variatsioonikordaja oli vastavalt 45 % (n = 36) ja 35 % (n = 38). Kui väärtused alla 40 % ja üle 100 % jäeti välja (esimeste puhul oletati ebasoodsaid tingimusi, teiste puhul mingeid tundmatuid põhjusi), vähenesid COV väärtused vastavalt 26 % ja 23 %-ni. Selliste „nõuetekohaste" väärtuste osakaal, milles saavutati vähemalt 60 % lagunemine, oli palmitiinhappe puhul 70 % ja polüetüleenglükool 400 puhul 83 %. Biolagunemise protsendi osa, mis määrati lahustunud anorgaanilise süsiniku mõõtmistest, oli suhteliselt madal, kuid muutuv. Palmitiinhappe puhul oli see vahemikus 0–35 %, keskmine 12 % ja COV 92 % ning polüetüleenglükool 4 000 puhul 0–40 %, keskmine 24 % ja COV oli 54 %.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Seadmed

13. Tavalised laboriseadmed ja järgmised seadmed:

a. sädemekindel inkubaator, mis hoiab temperatuuri 35 ± 2 °C;

▼M6

b. sobiva nominaalmahuga ([1]) ja rõhule vastupidavad klaasist katsenõud, millest igaüks on varustatud gaasi mitte läbilaskva membraaniga, mis talub survet ligikaudu 2 baari. Vabaruum peaks olema ligikaudu 10–30 % koguruumalast. Kui biogaasi vabaneb pidevalt, piisab vabaruumist 10 %, kuid kui gaas vabaneb alles katse lõpus, on vajalik vabaruum 30 %. Kui igal proovivõtuajal lastakse rõhul langeda, soovitatakse kasutada klaasist seerumipudeleid nominaalmahuga 125 ml ja üldmahuga ligikaudu 160 ml, mis on suletud seerumimembraaniga ([2]) ja sellele valtsitud alumiiniumrõngaga;

c. rõhumõõtmisseade, ([3]) mis sobib tekkiva gaasi mõõtmiseks ja väljalaskmiseks, näiteks käeshoitav täppismanomeeter, mis on varustatud sobiva süstlanõelaga; gaasipidav 3-käiguline kraan hõlbustab ülerõhu väljalaskmist (1. liide). Oluline on, et rõhu väljalaskmiseks kasutatava toru ja kraani siseruumala oleks võimalikult väike, nii et selle seadme ruumala arvestamata jätmisest tekkiv viga oleks ebaoluline;

Märkus: rõhu näitu kasutatakse otse selleks, et arvutada tekkinud süsiniku kogus vabaruumis (punktid 42–44). Teise võimalusena võib rõhunäidud sobiva teisendusgraafiku abil muuta tekkinud gaasi ruumaladeks (35 °C juures atmosfäärirõhul). Teisendusgraafik koostatakse andmete põhjal, mis saadakse teadaolevate lämmastiku ruumalade süstimisega katsenõudesse (näiteks seerumipudelitesse) 35 ± 2 °C juures ja saadavate stabiliseerunud rõhunäitude registreerimisega (vt 2. liide). Arvutus on esitatud punkti 44 märkuses.

Hoiatus: mikrosüstalde kasutamisel vältige torkevigastusi;

d. süsinikuanalüsaator, mis sobib anorgaanilise süsiniku otseseks määramiseks vahemikus 1–200 mg/l;

e. suure täpsusega süstlad gaasi- ja vedelikeproovide võtmiseks;

f. magnetsegajad ja magnetpulgad (soovi korral);

g. kindakapp (soovituslik).

Reagendid

14. Kogu katse vältel tuleb kasutada analüütiliselt puhtaid reagente.

([1]) Soovitatav suurus on 0,1–1 liiter.

([2]) Soovitatakse kasutada gaasikindlaid silikoonmebraane. Lisaks soovitatakse kontrollida membraanide gaasipidavust, kuna paljud müügil olevad membraanid, eelkõige butüülkumm-membraanid, ei ole metaani puhul piisavalt kindlad ning mõned membraanid hakkavad gaasi läbi laskma, kui neist katse tingimustes on nõel läbi torgatud.

([3]) Seadet tuleks kasutada ja regulaarselt kaliibrida vastavalt tootja juhendile. Kui kasutatakse ettenähtud kvaliteediga manomeetrit, mis on näiteks ümbritsetud terasmembraaniga, ei ole vaja seda laboris kaliibrida. Selle manomeetri kaliibrimise õigsust saab kontrollida laboris nii, et mõõdetakse üks rõhk 1×10^5 Pa ja võrreldakse seda mehhaanilise näidikuga manomeetri näiduga. Kui seade mõõdab selle ühe rõhu õigesti, on ka tema skaala lineaarsus muutmata. Kui kasutatakse muid mõõteseadmeid (millel ei ole sertifikaati tootja kaliibrimise kohta), soovitatakse kogu selle mõõtmisvahemik korrapäraste ajavahemike järel kaliibrida.

▼M6

Vesi

15. Destilleeritud või deioniseeritud vesi, mis on vabastatud hapnikust läbipuhumisega, milleks kasutatakse gaasilist lämmastikku hapnikusisaldusega alla 5 µl/l; vesi peab sisaldama vähem kui 2 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku (DOC).

Katsekeskkond

16. Valmistatakse lahjenduslahus, mis sisaldab järgmisi aineid näidatud koguses:

veevaba kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4	0,27 g
dinaatriumvesinikfosfaatdodekahüdraat, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	1,12 g
ammooniumkloriid, NH_4Cl	0,53 g
kaltsiumkloriiddihüdraat, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,075 g
magneesiumkloriidheksahüdraat, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,10 g
raud(II)kloriidtetrahüdraat, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$	0,02 g
resasuriin (hapniku indikaator)	0,001 g
naatriumsulfiidnonahüdraat, $Na_2S \cdot 9H_2O$	0,10 g
mikroelementide põhilahus (soovi korral, punkt 18)	10 ml
lisada hapnikuvaba vett (punkt 15)	kuni 1 liitrini

Märkus: kasutada tuleks värskelt tarnitud naatriumsulfiidi või see peaks olema pestud ja enne kasutamist kuivatatud, et tagada piisav taandamisvõime. Katse võib teha ilma kindakappi kasutamata (vt punkt 26). Sel juhul peaks naatriumsulfiidi lõppkontsentratsioon katsekeskkonnas olema suurem, 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ liitris. Naatriumsulfiidi võib lisada ka sobiva anaeroobse põhilahusena läbi suletud katsenõu membraani, kuna see vähendab oksüdeerumisohtu. Naatriumsulfiidi võib asendada titaan(III)tsitraadiga, mida lisatakse läbi suletud katsenõu membraani lõppkontsentratsioonini 0,8–1,0 mmol/l. Titaan(III)tsitraat on väga tõhus ja vähemürgine taandav reagent, mis valmistatakse järgmiselt: lahustakse 2,94 g trinaatriumtsitraatdihüdraati 50 ml hapnikuvabas vees (saadakse kontsentratsioon 200 mmol/l) ja lisatakse 5 ml 15 % (mass/maht) titaan(III)kloriidi lahust; lahuse pH viiakse leelisega 7 ± 0,2 juurde ja lahus viiakse lämmastikujoa all sobivasse nõusse; titaan(III)tsitraadi kontsentratsioon sellises põhilahuses on 164 mmol/l.

17. Katsekeskkonna komponendid, välja arvatud taandaja (naatriumsulfiid, titaantsitraat) segatakse ja lahusest puhutakse vahetult enne kasutamist läbi gaasilist lämmastikku umbes 20 minutit, et eemaldada hapnik. Seejärel lisatakse sobiv kogus värskelt valmistatud taandaja lahust (valmistatud hapnikuvabas vees) vahetult enne katsekeskkonna kasutamist. Katsekeskkonna pH viiakse vajaduse korral lahjendatud mineraalse happe või leelise abil 7 ± 0,2 peale.

▼M6

Mikroelementide põhilahus (soovi korral)

18. On soovitatav, et kasvukeskkond sisaldaks järgmisi mikroelemente, kuna see tõhustab anaeroobse lagunemise protsesse, eriti kui kasutatakse madalat inokulumi kontsentratsiooni (nt 1 g/l) (11).

mangaankloriidtetrahüdraat, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	50 mg
boorhape, H_3BO_3	5 mg
tsinkkloriid, $ZnCl_2$	5 mg
vask(II)kloriid, $CuCl_2$	3 mg
dinaatriummolübdaatdihüdraat, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1 mg
koobaltkloriidheksahüdraat, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	100 mg
nikkelkloriidheksahüdraat, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$	10 mg
dinaatriumselenit, Na_2SeO_3	5 mg
lisada hapnikuvaba vett (punkt 15)	kuni 1 liitrini

Uuritav aine

19. Uuritav aine lisatakse põhilahuse, suspensiooni või emulsioonina või otse tahke aine või vedelikuna või adsorbeerituna klaaskiudfiltrile, nii et lõppkontsentratsioon ei ületaks 100 mg orgaanilist süsinikku liitris. Kui kasutatakse põhilahust, tehakse sobiv lahus vees (punkt 15) (mis on enne gaasilise lämmastiku läbipuhumisega hapnikust vabastatud) sellise kontsentratsiooniga, et lisatav ruumala ei suurendaks reaktsioonisegu koguruumala rohkem kui 5 %. Põhilahuse pH viiakse vajaduse korral 7 ± 0,2 peale. Kui aine ei ole vees piisavalt lahustuv, tuleb järgida standardit ISO 10634 (13). Lahusti kasutamise korral tehakse täiendav kontroll, milles inokuleeritud kasvukeskkonnale lisatakse ainult lahustit. Orgaanilisi lahusteid nagu kloroform ja süsiniktetrakloriid, mis teadaolevalt takistavad metaani vabanemist, tuleks vältida.

Hoiatus: ettevaatlikult tuleb käsitseda mürgiseid aineid ja aineid, mille omadused ei ole teada.

Võrdlusained

20. Võrdlusaineid nagu naatriumbensoaat, fenool ja polüetüleenglükool 400 on edukalt kasutatud meetodi õige rakendamise kontrollimiseks; 60 päevaga toimub nendel ainetel biolagunemine enam kui 60 % ulatuses. Valmistatakse valitud võrdlusaine põhilahus (hapnikust vabastatud vees) samal viisil kui uuritava aine korral ning kui see on vajalik, reguleeritakse pH väärtuseni 7 ± 0,2.

Inhibeerimise kontroll (tingimisi vajalik)

21. Selleks et valida kõige sobivam kontsentratsioon katse jaoks, tuleb hankida teavet uuritava aine mürgisuse kohta anaeroobsetele mikroorganismidele; selleks lisatakse uuritavat ainet ja võrdlusainet katsekeskkonnaga (vt punkt 16) nõusse kumbagi samas kontsentratsioonis kui eespool lisatud (vt punktid 19 ja 20 ning ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Läbikäärinud muda

22. Kogutakse läbikäärinud muda reoveepuhasti käärimistankist, milles peamiselt töödeldakse olmereovett. Muda tuleks täielikult iseloomustada ja esitada muda kohta taustteave (vt punkt 54). Kui kasutatakse kohandatud inokulumi, võib kaaluda tööstusettevõtte reoveepuhasti läbikäärinud muda kasutamist. Läbikäärinud muda võtmiseks kasutatakse laia kaelaga pudeleid, mis võivad venida, näiteks kõrgtihedast polüetüleenist vms materjalist pudeleid. Pudel täidetakse mudaga kuni umbes 1 cm-ni ülemisest servast, ja suletakse õhukindlalt, eelistatav on kaitseventiiliga kork. Pärast laborisse toomist võib võetud muda kohe kasutada või panna see laboratoorsesse kääritustanki. Biogaasi ülerõhku tuleb pudelite ettevaatliku avamisega välja lasta. Teise võimalusena võib inokulumiallikana kasutada laboris kasvatatud anaeroobset muda, kuid selle aktiivsuse spekter võib olla väiksem.

Hoiatus: läbikäärinud mudast vabaneb süttivaid gaase, mis tekitab tulekahju- ja plahvatusohtu; samuti võib see sisaldada patogeenseid organisme, seepärast tuleb reoveemuda käsitsemisel olla ettevaatlik. Ohutusega seotud põhjustel ei kasutata muda võtmiseks klaasnõusid.

23. Mudast taustgaaside vabanemise ja tühikatsete mõju vähendamiseks võib kaaluda muda eelnevat kääritamist. Kui on vajalik eelkääritamine, tuleks mudal lasta ilma toitainete või substraatide lisamiseta käärida 35 ± 2 °C kuni 7 päeva. On leitud, et umbes 5-päevane eelkääritamine annab tühikatsest gaasi vabanemise puhul optimaalse tulemuse, ilma et liiga palju pikeneks oote- või inkubatsiooniperiood katsefaasi jooksul või väheneks aktiivsus selle väikse arvu ainete suhtes, mida on uuritud.

24. Kui uuritav aine on – või eeldatavalt on – halvasti biolagundatav, võib kaaluda muda eelnevat kokkupuutesse viimist uuritava ainega, et saada paremini kohanenud inokulum. Sellisel juhul lisatakse läbikääritatud mudale uuritavat ainet orgaanilise süsiniku sisalduseni 5–20 mg/l ja inkubeeritakse kuni 2 nädalat. Eelnevalt kokkupuutes olnud aktiivmuda pestakse hoolikalt enne kasutamist (vt punkt 25) ning katseprotokollis kirjeldatakse eelneva kokkupuute puhul kasutatud tingimusi.

Inokulum

25. Aktiivmuda pestakse (vt punktid 22–24) vahetult enne kasutamist, et vähendada anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon alla 10 mg/l lõplikus katsesuspensioonis. Muda tsentrifuugitakse suletud topsides (nt 3 000 g 5 minuti jooksul) ja supernatant visatakse ära. Sade tsentrifuugitopsi põhjas suspendeeritakse hapnikuvabas keskkonnas (punktid 16 ja 17), suspensioon tsentrifuugitakse uuesti ja supernatant visatakse jälle ära. Kui anorgaanilise süsiniku sisaldus ei ole veel piisavalt vähenenud, võib muda pesemist korrata kuni kaks korda. Näib, et mikroorganismidele see halvasti ei mõju. Lõpuks suspendeeritakse tsentrifuugimisel saadud sade vajalikus koguses katsekeskkonnas ja määratakse tahkete osakeste üldsisaldus [vt näiteks ISO 11923 (15)]. Tahkete osakeste lõplik kontsentratsioon katsenõus peaks olema vahemikus 1–3 g/l (või ligikaudu 10 % lahjendamata läbikääritatud muda kontsentratsioonist). Eespool nimetatud toimingud tuleb teha nii, et muda kokkupuude hapnikuga oleks minimaalne (võib töötada näiteks lämmastiku atmosfääris).

▼M6

KATSE KÄIK

26. Järgmiste ettevalmistavate tööde puhul tuleb läbikääritatud muda ja hapniku kokkupuude viia praktiliselt võimaliku miinimumini, näiteks on võib-olla vajalik töötada kindakapis lämmastiku atmosfääris ja/või puhuda pudelitest läbi lämmastikku (4).

Uuringukatsete ja kontrollkatsete ettevalmistamine

27. Valmistage ette katsenõud vähemalt kolme paralleelkatse jaoks (vt punkt 13-b) uuritava ainega, tühikatsetega, võrdlusainega, inhibeerimise kontrollkatsega (tingimuslik) ja rõhukontrolli kambritega (soovituslik) (vt punktid 7 ja 19–21). Ette võib valmistada ka täiendavad nõud primaarse biolagundatavuse hindamiseks uuritava aine spetsiifilise määramise teel. Sama tühikatsete komplekti võib kasutada mitme uuritava aine puhul ühes ja samas katses, kui vabaruumi mahud on ühesugused.

28. Valmistage ette lahjendatud inokulum, enne kui hakkate seda lisama katsenõudesse, näiteks laiaotsalise pipeti abil. Lisage hästi segatud inokulumi alikvoodid (punkt 25), nii et tahkete osakeste üldkontsentratsioon oleks kõikides nõudes ühesugune (vahemikus 1–3 g/l). Lisage uuritava aine ja võrdlusaine põhilahused pärast seda, kui olete vajaduse korral korrigeerinud pH väärtuseni 7 ± 0,2. Uuritav aine ja võrdlusaine tuleb lisada kõige asjakohasema manustamismeetodiga (punkt 19).

29. Orgaanilise süsiniku kontsentratsioon katses peaks tavaliselt olema vahemikus 20–100 mg/l (punkt 4). Kui uuritav aine on mürgine, tuleks vähendada selle kontsentratsioon katses väärtuseni 20 mg C/l või isegi alla selle, kui mõõdetakse primaarset biolagunemist konkreetse aine spetsiifilise analüüsiga. Tuleks märkida, et madalamal uuritava aine kontsentratsioonil katse tulemuste varieeruvus suureneb.

30. Tühikatsenõudesse lisage uuritava aine põhilahuse, suspensiooni või emulsiooni asemel samasugused kogused vastavat vedelikku, mida kasutati uuritava aine lisamiseks. Kui uuritav aine lisati klaaskiudfiltri või orgaanilise lahusti kasutamisega, lisage tühikatsenõudesse filter või samasugune kogus lahustit, mis aurustati. Valmistage lisaks ette eraldi paralleelkatsed uuritava ainega pH väärtuse mõõtmiseks. Korrigeerige pH 7 ± 0,2-ni, lisades vajaduse korral väikese koguse lahjendatud mineraalhapet või leelist. Ühesugused kogused pH neutraliseerimiseks kasutatud ainet tuleks lisada kõikidesse nõudesse. Sellised pH korrigeerimised ei peaks olema vajalikud, kuna uuritava aine ja võrdlusaine põhilahuste pH on juba seatud neutraalseks (vt punktid 19 ja 20). Kui tuleb mõõta primaarset biolagunemist, tuleks sobiv proov võtta pH kontrollimise nõust või täiendavast katsenõust ja määrata selles uuritava aine sisaldus spetsiifilise analüüsiga. Kõikidesse nõudesse võib lisada kaetud magnetid (magnetpulgad), kui reaktsioonisegu on vaja segada (ei ole kohustuslik).

31. Hoolitsege selle eest, et vedeliku üldruumala V_l ja vabaruumi ruumala V_h oleks kõigis nõudes ühesugused; määrake V_l ja V_h ning märkige need üles. Iga nõu tuleks sulgeda gaasimembraaniga ja viia kindakapist (vt punkt 26) üle inkubaatorisse (vt punkt 13-a).

▼M6

Lahustumatu uuritav aine

32. Vees halvasti lahustuva aine kaalutud kogus lisage otse ettevalmistatud nõusse. Kui on vaja kasutada lahustit (vt punkt 19), viige uuritava aine lahus või suspensioon tühjadesse nõudesse. Võimaluse korral aurustage lahusti lämmastiku läbijuhtimisega ja seejärel lisage vajalikud kogused ülejäänud koostisaineid, nimelt lahjendatud muda (punkt 25) ja hapnikuvaba vett. Tuleks ette näha ka täiendav lahusti kontrollkatse (vt punkt 19). Lahustumatu aine lisamise muude meetodite kohta vt ISO 10634 (13). Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida süstlaga täielikult ettevalmistatud ja suletud nõudesse, kui eeldatakse, et pH lähteväärtus ei ületa 7 ± 1, muul juhul doseerige nii, nagu eespool kirjeldatud (vt punkt 19).

Inkubeerimine ja gaasi rõhu mõõtmised

33. Ettevalmistatud nõusid inkubeerige umbes 1 tund temperatuuril 35 ± 2 °C, et toimuks tasakaalustumine ja liigne gaas eralduks atmosfääri; selleks loksutage järjekorras iga nõu, torgake rõhumõõtmisseadme (punkt 13-c) nõel läbi membraani ja avage kraan, kuni manomeeter näitab 0-rõhku. Kui selles staadiumis või vahepealsete mõõtmiste tegemisel on rõhk vabaruumis atmosfäärirõhust madalam, tuleks lisada gaasilist lämmastikku, et rõhk oleks võrdne atmosfäärirõhuga. Sulgege kraan (vt punkt 13-c) ja jätkake inkubeerimist pimedas nii, et kõigi nõude kõik osad oleksid kääritamistemperatuuri juures. Jälgige nõusid pärast inkubeerimist 24–48 tundi. Jätke katsest välja kõik nõud, mille supernatantvedelik värvub selgelt roosaks, mis tähendab, et resasuriin (vt punkt 16) on muutnud värvi, mis näitab hapniku juuresolekut (vt punkt 50). Väikest hapnikukogust võib süsteem taluda, kuid suurem hapniku kontsentratsioon võib oluliselt pärssida anaeroobset biolagundamist. Kolmest paralleelkatsest ühe üksiku nõu väljajätmine on lubatav, kuid kui selliseid nõusid on rohkem, tuleb katse tegemise korraldus läbi vaadata ja katset korrata.

34. Segage või loksutage iga nõu sisu hoolikalt mõne minuti jooksul vähemalt 2 või 3 korda nädalas ja natuke aega enne iga rõhumõõtmist. Loksutamine viib inokulumi uuesti suspensiooni ja tagab gaaside tasakaalu. Kõik rõhu mõõtmised tuleb teha kiiresti, sest kui mõõtmise ajal temperatuur langeb, saadakse vale näit. Rõhu mõõtmise ajal tuleks kogu katsenõud, kaasa arvatud vabaruum, hoida kääritamistemperatuuril. Mõõtke gaasi rõhk näiteks nii, et surute rõhumõõtmisseadmega ühendatud süstla nõela (punkt 13-c) läbi membraani. Tuleks olla hoolikas, et vältida vee sattumist süstlanõela sisse; kui selline asi juhtub, tuleb märjaks saanud osad kuivatada ja panna süstla otsa uus nõel. Rõhk tuleks mõõta millibaarides (vt punkt 42). Gaasi rõhku nõus võib mõõta perioodiliselt, näiteks kord nädalas, ja soovi korral võib liigse gaasi lasta atmosfääri. Teine võimalus on mõõta rõhk ainult katse lõpul, et määrata moodustunud biogaasi kogus.

35. Soovitatav on gaasi rõhku mõõta vahepeal, kuna rõhu suurenemine võimaldab hinnata, millal võib katse lõpetada ja nii saab jälgida ka biolagunemise kineetikat (vt punkt 6).

▼M6

36. Tavaliselt lõpetatakse katse pärast 60-päevast inkubeerimist, kui rõhu mõõtmisest leitud biolagunemise kõver ei ole juba enne seda platoole jõudnud; platoofaas on faas, kus on jõutud maksimaalse lagunemiseni ja biolagunemise kõver muutub horisontaalseks. Kui platoo väärtus on väiksem kui 60 %, on tulemust raske tõlgendada, kuna see näitab, et ainult osa molekulist on mineraliseeritud või et on tehtud viga. Kui tavalise inkubeerimisaja lõpus gaasi üha tekib ja platoofaasi ilmselt ei ole saavutatud, tuleks kaaluda katse pikendamist, et kontrollida, kas saavutatakse platoo väärtus (> 60 %).

Anorgaanilise süsiniku mõõtmine

37. Pärast viimast gaasi rõhu mõõtmist katse lõpus laske mudal settida. Avage järjest iga nõu ja võtke kohe proov anorgaanilise süsiniku (IC) kontsentratsiooni (mg/l) määramiseks supernatantvedelikus. Supernatantvedelikku ei tohiks tsentrifuugida ega filtrida, kuna sellele kaasneks lubamatu lahustunud süsinikdioksiidi kadu. Kui vedelikku ei saa analüüsida kohe proovi võtmise ajal, võite säilitada proovi ilma vabaruumita suletud viaalis kuni kaks päeva temperatuuril 4 °C. Pärast anorgaanilise süsiniku mõõtmist mõõdetakse ja registreeritakse pH väärtus.

38. Teise võimalusena võib anorgaanilise süsiniku supernatandis määrata kaudselt lahustunud anorgaanilise süsiniku ehk süsinikdioksiidi vabanemise kaudu, mille saab mõõta vabaruumis. Pärast viimast gaasi rõhu mõõtmist reguleeritakse rõhk igas katseanumas atmosfäärirõhule. Iga nõu sisu hapustatakse ligikaudu pH 1-ni kontsentreeritud mineraalhappe (nt H_2SO_4) lisamisega läbi suletud nõu membraani. Loksutatud nõusid inkubeeritakse temperatuuril 35 ± 2 °C umbes 24 tundi ja mõõdetakse rõhumõõtjaga gaasi rõhk, mis on tekkinud süsinikdioksiidi vabanemise tõttu.

39. Samasugused lugemid võetakse ka vastavate tühikatsete, võrdlusaine ja inhibeerimise kontrollnõu (kui seda kasutati) puhul (vt punkt 21).

40. Mõnel juhul, eriti kui samu kontrollkatsenõusid kasutatakse mitme uuritava aine puhul, tuleks mõelda vahepealsele anorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni mõõtmisele nii katse- kui ka kontrollkatsenõudes, kui see on asjakohane. Sellisel juhul tuleb ette valmistada piisaval arvul nõusid, et jätkuks ka kõigi vahepealsete mõõtmiste jaoks. Selline meetod on eelistatav kõikide proovide võtmisele ainult ühest nõust. Viimast võib teha ainult siis, kui lahustunud anorgaanilise süsiniku määramiseks vajalikku proovi mahtu ei peeta liiga suureks. Lahustunud anorgaaniline süsinik tuleks määrata pärast gaasi rõhu mõõtmist ilma liigset gaasi välja laskmata, nagu on kirjeldatud allpool:

— võtke süstla abil läbi membraani ilma nõu avamata võimalikult väikesemahuline proov supernatandist ja määrake proovis anorgaaniline süsinik;

— pärast proovi võtmist lastakse liigne gaas välja või ei lasta;

— tuleks võtta arvesse, et isegi väike supernatandi koguse vähenemine (nt 1 %) võib oluliselt suurendada vabaruumis oleva gaasi ruumala (V_h);

— võrranditesse (vt punkt 44) viiakse vajaduse korral sisse parandid, millega arvestatakse V_h suurenemist võrrandis 3.

▼M6

Spetsiifilised analüüsid

41. Kui on vaja määrata primaarset anaeroobset lagunemist (vt punkt 30), võtke vajaliku mahuga proov uuritava ainega nõust katse alguses ja lõpus. Kui te seda teete, siis pange tähele, et vabaruumi ja vedelikufaasi ruumalad, vastavalt V_h ja V_l, muutuvad ning seda tuleb võtta arvesse gaasi tekkimise tulemuste arvutamisel. Teise võimalusena võib proove konkreetse aine määramiseks võtta täiendavatest katsesegudest, mis on selleks eelnevalt ette nähtud (punkt 30).

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

42. Praktilistel põhjustel mõõdetakse gaasi rõhku millibaarides (1 mbar = 1 hPa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), mahtusid liitrites ja temperatuuri Celsiuse kraadides.

Süsinik vabaruumis

43. Kuna nii 1 mool metaani kui ka üks mool süsinikdioksiidi sisaldab kumbki 12 g süsinikku, võib süsiniku massi tekkinud gaasis väljendada järgmiselt:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Võrrand 1}$$

kus:

m = süsiniku mass (mg) vabanenud gaasi teatavas ruumalas;

12 = süsiniku suhteline aatommass;

n = gaasi moolide arv antud ruumalas.

Kui olulistes kogustes tekib muid gaase peale metaani või süsinikdioksiidi (nt N_2O), tuleb võrrandit 1 muuta, et kirjeldada tekkinud gaaside võimalikku mõju.

44. Gaaside seadustest võib *n* väljendada järgmiselt:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Võrrand 2}$$

kus:

p = gaasi rõhk (paskalites);

V = gaasi ruumala (m^3);

R = universaalne gaasikonstant [8,314 J/(mol K)]

T = inkubeerimistemperatuur (kelvinites).

Ühendame võrrandid 1 ja 2 ning võtame arvesse ka tühikatses vabaneva gaasi:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Võrrand 3}$$

kus:

m_h = gaasina vabaruumis oleva puhta süsiniku mass (mg);

Δp = esialgse ja lõpliku gaasirõhu vahe keskmine, millest on lahutatud vastav tühikatsenõude keskmine (millibaarides);

▼**M6**

V_h = vabaruumi maht nõus (l);

0,1 = tegur, millega teisendatakse njuuton/m^2 millibaarideks ja m^3 liitriteks.

Võrrandit 4 tuleks kasutada tavapärase inkubeerimise puhul temperatuuril 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Võrrand 4}$$

Märkus: Alternatiivne mahu arvutamine. Rõhumõõtja näidud teisendatakse vabanenud gaasi milliliitriteks, kasutades standardkõverat, mis saadakse sissesüstitud ruumala (ml) ja vastavate rõhumõõtja näitude kandmisega graafikule (2. liide). Gaasi moolide arv (n) iga nõu vabaruumis arvutatakse nii, et kumulatiivne vabanenud gaasi ruumala (ml) jagatakse teguriga 25 286 ml/mol, mis on ühe mooli gaasi poolt enda alla võetav ruumala 35 °C juures atmosfäärirõhul. Kuna 1 mool CH_4 ja 1 mool CO_2 sisaldab kumbki 12 g süsinikku, on süsiniku mass (mg) vabaruumis (m_h) leitav võrrandiga 5:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Võrrand 5}$$

Tühikatse tulemuste arvessevõtmine, et arvestada gaasi tekkimist tühikatses:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Võrrand 6}$$

kus:

m_h = gaasina vabaruumis oleva puhta süsiniku mass (mg);

ΔV = uuritava ainega katsenõude ja tühikatsenõude vabaruumis oleva gaasi ruumala erinevuste keskväärtus;

25286 = ruumala, mille võtab enda alla 1 mool gaasi temperatuuril 35 °C ja rõhul 1 atmosfäär.

45. Biolagundamise käiku võib vajaduse korral jälgida kumuleeritud rõhu kasvu järgi, pannes graafikule D*p* (millibaarides) sõltuvana ajast. Saadud kõvera abil tehakse kindlaks ootefaasi pikkus (päevades), mis kantakse protokolli. Ootefaas on aeg katse algusest kuni olulise lagunemise alguseni (vt näide, 3. liide). Kui supernatandist on võetud ja analüüsitud vahepealseid proove (vt punktid 40, 46 ja 47), võib kumulatiivse rõhu asemel panna graafikule vabanenud üldsüsiniku (gaasi- ja vedelfaasis).

Süsinik vedelfaasis

46. Metaani kogust vedelfaasis ignoreeritakse, kuna selle lahustuvus vees on teatavasti väga vähene. Anorgaanilise süsiniku mass katsenõude vedelfaasis arvutatakse võrrandi 7 järgi:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Võrrand 7}$$

kus:

m_l = anorgaanilise süsiniku mass (mg) vedelfaasis;

C_{net} = anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon (mg/l) katseanumates, millest on lahutatud kontsentratsioon kontrollnõudes katse lõpul;

V_l = vedeliku maht nõus (l);

▼M6

Gaasistatud süsiniku kogusisaldus

47. Gaasistatud süsiniku kogumass katsenõus arvutatakse võrrandi 8 järgi:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Võrrand 8}$$

kus:

m_t = gaasistatud süsiniku kogumass (mg);

m_h ja m_l on defineeritud eespool.

Uuritava aine süsinik

48. Uuritavast ainest saadud süsiniku mass katsenõus arvutatakse võrrandi 9 järgi:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Võrrand 9}$$

kus:

m_v = uuritavast ainest saadud süsiniku mass (mg);

C_c = uuritavast ainest saadud süsiniku kontsentratsioon (mg/l) katsenõus

V_l = vedeliku maht katsenõus (l).

Biolagunemise määr

49. Biolagunemise protsent arvutatakse vabaruumis olevast gaasist võrrandi 10 järgi ja üldise biolagunemise protsent võrrandi 11 järgi:

$$D_h = (m_h / m_v) \times 100 \quad \text{Võrrand 10}$$

$$D_t = (m_t / m_v) \times 100 \quad \text{Võrrand 11}$$

kus:

D_h = biolagunemise protsent vabaruumis oleva gaasikoguse järgi;

D_t = summaarne biolagunemine (%);

m_h, m_v ja m_t on defineeritud eespool.

Primaarse biolagunemise määr arvutatakse uuritava aine kontsentratsiooni mõõtmisest (soovi korral) inkubeerimise alguses ja lõpus võrrandi 12 järgi:

$$D_p = (1 - S_e / S_i) \times 100 \quad \text{Võrrand 12}$$

kus:

D_p = uuritava aine primaarse biolagunemise protsent;

S_i = uuritava aine lähtekontsentratsioon (mg/l)

S_e = uuritava aine kontsentratsioon katse lõpus (mg/l).

Kui analüüs näitab uuritava aine olulist kontsentratsiooni anaeroobse muda muutmata inokulumis, tuleb kasutada võrrandit 13:

▼M6

$$D_p^{\ 1} = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Võrrand 13}$$

kus:

$D_p^{\ 1}$ = uuritava aine primaarse biolagunemise parandatud protsent;

S_{ib} = uuritava aine „näiline” lähtekontsentratsioon (mg/l);

S_{eb} = uuritava aine „näiline” lõppkontsentratsioon (mg/l) tühikatsetes.

Tulemuste nõuetekohasus

50. Tuleks kasutada ainult selliste nõude rõhu mõõtmise tulemusi, milles ei ole märgata roosat värvust (vt punkt 33). Anaeroobse käitlemise meetodite nõuetekohane kasutamine viib hapnikuga saastumise miinimumini.

51. Katse võib lugeda nõuetekohaseks ainult juhul, kui võrdlusaine jõuab platooni, mis vastab enam kui 60 % biolagunemisele ([1]).

52. Kui pH katse lõpus oli läinud välja vahemikust 7 ± 1 ja biolagunemine oli ebapiisav, tuleb katset korrata katsekeskkonnaga, mille puhvermahtuvus on suurem.

Lagunemise pärssimine

53. Gaasi vabanemine nõudes, milles on nii uuritav aine kui ka võrdlusaine, peaks olema vähemalt sama suur kui nõudes, mis sisaldavad ainult võrdlusainet; vastasel korral on tegemist gaasi tekke pärssimisega. Mõnel juhul on gaasi vabanemine uuritava ainega, kuid ilma võrdlusaineta nõus väiksem kui tühikatse kontrollnõus, mis näitab, et uuritaval ainel on inhibeeriv mõju.

Katseprotokoll

54. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav aine:

— tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— uuritava aine puhtusaste (lisandid).

Katsetingimused:

— lahjendatud kääritusnõuvedeliku maht (V_l) ja nõu vabaruumi maht (V_h);

— katsenõude kirjeldus, biogaasi määramise kirjeldus (näiteks rõhumõõtja tüüp) ja anorgaanilise süsiniku analüsaatori kirjeldus;

— uuritava aine ja võrdlusaine lisamine katsesüsteemi: katses kasutatud kontsentratsioon ja lahustite kasutamine;

— andmed kasutatud inokulumi kohta: reoveepuhasti nimi, reoveepuhasti kirjeldus (nt töötemperatuur, muda retentsiooniaeg, peamiselt olmereovesi jne), kontsentratsioon, igasugune teave, mis on vajalik selle põhjendamiseks ja teave inokulumi eeltöötlemise kohta (nt eelkääritamine, eelnevasse kokkupuutesse viimine);

— inkubatsioonitemperatuur;

— paralleelkatsete arv.

([1]) Seda tuleks uuesti hinnata, kui võrdlusainete hulgas on adsorbeerumisele kalduvaid või lahustumatuid aineid.

▼M6

Tulemused:

— pH ja anorgaanilise süsiniku sisaldus katse lõpus;

— uuritava aine kontsentratsioon katse alguses ja lõpus, kui mõõdeti konkreetset ainet;

— kõik andmed, mis mõõdeti uuritava aine katses, tühikatses, võrdlusaine katses ja vajaduse korral inhibeerimise kontrollnõudes (nt rõhk millibaarides, anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon (mg/l)) tabeli kujul (eraldi tuleb esitada vabaruumis ja vedelikus mõõdetud andmed);

— andmete statistiline analüüs, katse kestus ja biolagunemise kõver uuritava aine ja võrdlusaine ning inhibeerimise kontrollkatsete korral;

— uuritava aine ja võrdlusaine biolagunemise protsent;

— iga katsetulemuste arvestamata jätmise põhjendus;

— tulemuste arutelu.

KIRJANDUS

(1) Käesoleva lisa järgmised peatükid:

C.4, Kohese biolagunduvuse määramine;

C.9, Biodegradatsioon – Zahni-Wellensi test;

C.10, Reovee aeroobse töötlemise simulatsioonikatse:

A: aktiivmuda, B: biokiled

C.11, Biodegradatsioon – aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼M6

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.

(12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

(13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

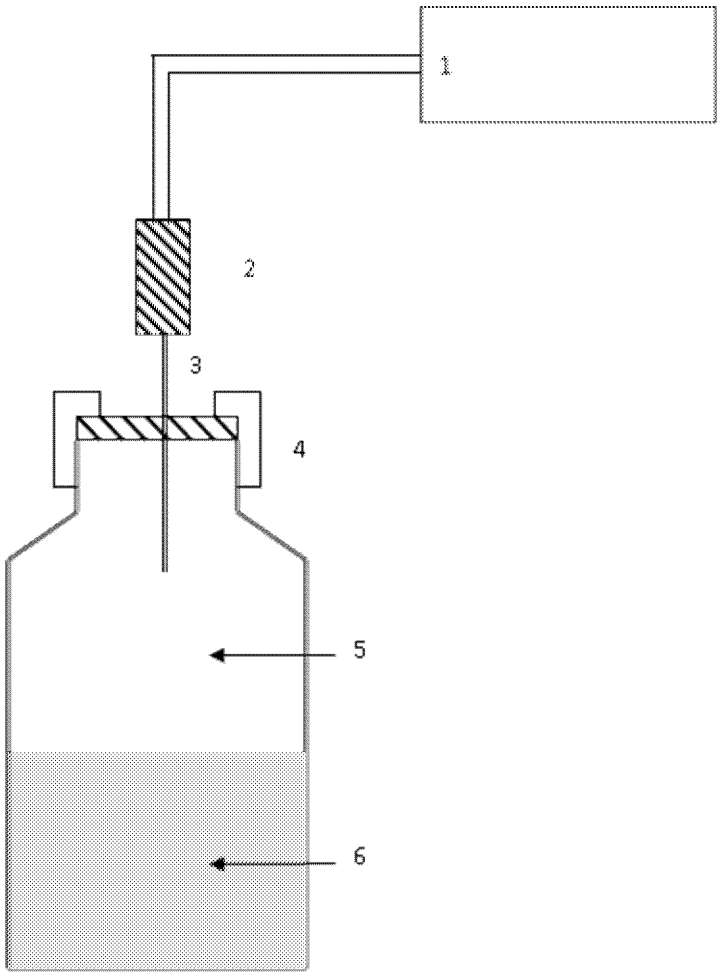
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

1. liide

Näidisseade biogaasi tootmise mõõtmiseks gaasi rõhu järgi



Selgitus:

1 – rõhumõõtur

2 – gaasipidav 3-käiguline kraan

3 – süstlanõel

4 – gaasi mitte läbilaskev sulgur (valtsitav rõngaskork ja membraan)

5 – vabaruum (V_h)

6 – läbikääritatud muda inokulum (V_I)

Katsenõusid inkubeeritakse temperatuuril 35 ± 2 °C

▼M6

2. liide

Rõhumõõturi näitude teisendamine

Rõhumõõturi näitusid võib gaasi ruumalaga siduda standardkõvera abil, mis saadakse teadaoleva ruumalaga õhukoguste süstimisega 35 ± 2 °C juures seerumipudelitesse, milles on reaktsioonisegu ruumalaga V_R võrdne kogus vett:

— viiesse seerumipudelisse, mida on hoitud temperatuuril 35 ± 2 °C, viiakse vee alikvoodid ruumalaga V_R ml. Pudelid suletakse ja pannakse veevanni 35 °C juurde 1 tunniks tasakaalustuma;

— rõhumõõtur lülitatakse sisse, lastakse stabiliseeruda ja viiakse selle näit 0 peale;

— süstlanõel torgatakse läbi ühe nõu membraani, avatakse kraan, kuni rõhumõõtur näitab rõhku 0 ja suletakse siis kraan;

— sama korratakse ülejäänud pudelitega;

— igasse pudelisse süstitakse 1 ml õhku temperatuuriga 35 ± 2 °C. Rõhumõõturiga ühendatud nõel surutakse läbi membraani ühte pudelisse ja lastakse rõhu näidul stabiliseeruda. Märgitakse rõhk üles, avatakse kraan, kuni rõhk on 0, ja seejärel kraan suletakse;

— sama korratakse ülejäänud pudelitega;

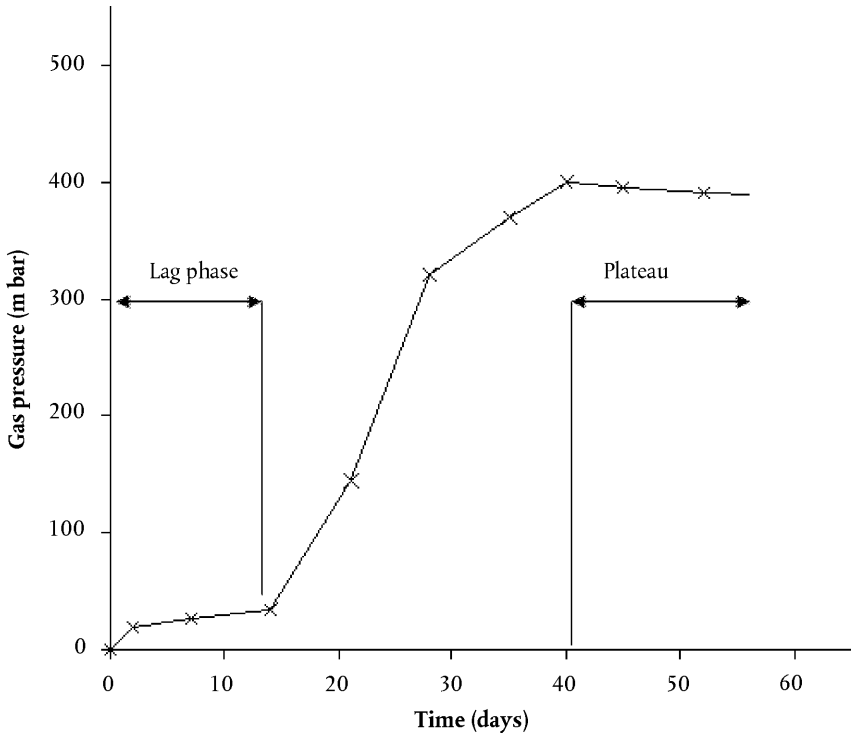
— kogu seda tegevust korratakse 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ja 50 ml õhuga;

— koostatakse kõver rõhunäitude (Pa) sõltuvuse kohta sissesüstitud gaasi mahust (ml). Mõõturi näidud on lineaarsed rõhu vahemikus 0–70 000 Pa ja vabanenud gaasi ruumala vahemikus 0–50 ml.

▼**M6**

3. liide

Lagunemiskõvera näide (kumulatiivne netorõhu suurenemine)



▼M6

4. Liide

Anaeroobse biolagunemise katse näidisandmelehed – andmeleht uuritava aine kohta

Labor: ..... Uuritav aine: ..... Katse nr: .....

Katsetemperatuur, °C: ..... Vabaruumi maht (V_h): .....(l) Vedelfaasi maht (V_l): .....(l)

Süsinikku uuritavas aines $C_{c,v}$: .....(mg/l)) m_v [1]: .....(mg)

Päev	p_1 (katse) (mbar)	p_2 (katse) (mbar)	p_3 (katse) (mbar)	p (katse) keskmine (mbar)	p_4 (tühikatse) (mbar)	p_5 (tühikatse) (mbar)	p_6 (tühikatse) (mbar)	p (tühikatse) keskmine (mbar)	p (neto) katse – tühikatse keskmine (mbar)	Δp (neto) kumulatiivne (mbar)	m_h vabaruumi C [2] (mg)	D_h Biolagunemine [3] (%)

	$C_{IC,\ 1}$ katse (mg)	$C_{IC,\ 2}$ katse (mg)	$C_{IC,\ 3}$ katse (mg)	C_{IC} katse keskmine (mg)	$C_{IC,\ 4}$ tühikatse (mg)	$C_{IC,\ 5}$ tühikatse (mg)	$C_{IC,\ 6}$ tühikatse (mg)	C_{IC} tühikatsete keskmine (mg)	$C_{IC,\ net}$ katse – tühikatse keskmine (mg)	m_l vedelfaasis C [4] (mg)	m_t kokku C [5] (mg)	D_t Biolagunemine [6] (%)
Anorg. C (lõpp)												
pH (lõpp)												

[1] süsinikku katsenõus, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

[2] Süsinikku vabaruumis, m_h (mg) normaalsel inkubeerimistemperatuuril (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

[3] Biolagunemine, mis on arvutatud vabaruumis olevast gaasist, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_{vv}$

[4] Süsinik vedelfaasis, m_l *(mg):* $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

[5] Gaasistatud süsiniku kogusisaldus, m_t (mg): $m_t + m_l$

[6] Summaarne biolagunemine, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

02008R0440 — ET — 16.10.2019 — 008.001 — 2374

▼M6

Labor: ..... Võrdlusaine: ..... Katse nr: .....

Katsetemperatuur, °C: ..... Vabaruumi maht (V_h): ..... Vedelfaasi maht (V_l): .....(l)

Süsinikku võrdlusaines $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) (mg):

Päev	p_1 (võrdlus) (mbar)	p_2 (võrdlus) (mbar)	p_3 (võrdlus) (mbar)	p (võrdlus) keskmine (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) keskmine (mbar)	p (võrdlus) võrdlusaine – tühikatse (mbar)	Δp (võrdlus) kumulatiivne (mbar)	m_h vabaruumi C ([2]) (mg)	D_h Biolagunemine ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ võrdlusaine (mg)	$C_{IC,\ 2}$ võrdlusaine (mg)	$C_{IC,\ 3}$ võrdlusaine (mg)	C_{IC} võrdlusaine keskmine (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} inhib. keskmine (mg)	$C_{IC,\ net}$ võrdlusaine – inhib. (mg)	m_l vedelfaasis C ([4]) (mg)	m_t kokku C ([5]) (mg)	D_t Biolagunemine ([6]) (%)
Anorg. C (lõpp)												
pH (lõpp)												

([1]) Süsinikku katsenõus, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Süsinikku vabaruumis, m_h (mg) normaalsel inkubeerimistemperatuuril (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Biolagunemine, mis on arvutatud vabaruumis olevast gaasist, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

([4]) Süsinikku vedelfaasis,m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

([5]) Gaasistatud süsiniku kogusisaldus, m_t (mg): $m_t + m_l$

([6]) Summaarne biolagunemine, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

▼M6

C.44. LEOSTUMINE MULLAKOLONNIS

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 312 (2004). Sünteetilised kemikaalid satuvad pinnasesse kas otse, teadliku pinnasesse viimisega (nt põllumajanduskemikaalid) või kaudselt (nt reovesi → reoveesete → muld või õhk → märg- või kuivsadenemine). Selliste kemikaalide riskihindamiseks on oluline eelnevalt hinnata seda, kas need kemikaalid võivad mullas muunduda ning liikuda (leostuda) edasi mulla sügavamatesse kihtidesse ja lõpuks põhjavette.

2. Kemikaalide võimaliku mullas leostumise mõõtmiseks kontrollitud laboritingimustes on mitu meetodit, näiteks mulla õhukese kihi kromatograafia, mulla paksu kihi kromatograafia, mulla kolonnkromatograafia ning adsorptsiooni ja desorptsiooni mõõtmised (1, 2). Mitteioniseerunud kemikaalide korral võimaldab *n*-oktanooli-vee jaotuskoefitsient (P_{ow}) varakult hinnata nende võimalikku adsorptsiooni ja leostumist (3, 4, 5).

3. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud meetod põhineb häiritud mulla kolonnkromatograafial (mõisted vt 1. liide). Tehakse kahte tüüpi katseid, et määrata kontrollitud laboritingimustes i) uuritava kemikaali võimalik leostumine mullas, ja ii) kemikaali muundumissaaduste võimalik leostumine mullas (uuring vanandatud jääkidega) ([1]). Katsemeetod põhineb olemasolevatel meetoditel (6, 7, 8, 9, 10, 11).

4. Käesolevas katses kasutatavate mullaproovide arvu ja tüüpide osas lepiti kokku mulla ja sette valimist käsitlevas OECD töörühmas, mis tuli kokku Itaalias Belgirates 1995. aastal (12). Samuti andis töörühm soovitusi mullaproovide kogumise, käsitsemise ja säilitamise kohta leostumiskatsete puhul

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

5. Kolonnid, mis on valmistatud sobivast inertsest materjalist (nt klaas, roostevaba teras, alumiinium, teflon, polüvinüülkloriid jne), täidetakse mullaga ja seejärel küllastatakse ja tasakaalustatakse „kunstliku vihma” lahusega (mõiste vt 1. liide) ja nõrutatakse. Seejärel kantakse iga mullakolonni pinnale uuritavat kemikaali ja/või uuritava kemikaali vanandatud jääke. Seejärel hakatakse mullakolonni voolutama kunstliku vihmaga ja kogutakse nõrgvesi. Pärast leostamisprotsessi eemaldatakse muld kolonnist ja jagatakse sobivaks arvuks osadeks olenevalt sellest, millist teavet tahetakse saada. Iga mullasamba osa ja nõrgvett analüüsitakse uuritava kemikaali ja vajaduse korral muundumissaaduste või muude huvipakkuvate kemikaalide määramiseks.

KATSEMEETODI KASUTATAVUS

6. Katsemeetodit saab kasutada (märgistamata või radioaktiivse märgisega, nt ^{14}C) uuritavate kemikaalide puhul, mille jaoks on olemas piisava täpsuse ja tundlikkusega määramismeetodid. Katsemeetodit ei kasutata kemikaalide puhul, mis lenduvad kergesti pinnasest ja veest ning mida seepärast ei jää selle katsemeetodi tingimustes mulda ega nõrgvette.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

7. Mullakolonnis leostumise mõõtmiseks võib kasutada märgistamata või radioaktiivse märgisega uuritavat kemikaali. Radioaktiivse märgisega ainet on vaja selleks, et uurida muundumissaaduste (vanandatud uuritava kemikaali jäägid)

([1]) Taimekaitsevahendite kolonnis leostumise uuringud võivad anda teavet uuritava kemikaali ja selle muundumissaaduste liikuvuse kohta ja võivad täiendada partiiviisilisi sorptsiooni uuringuid.

▼**M6**

leostumist ja määrata massibilanssi. Soovitatakse kasutada ^{14}C-märgist, kuid muud isotoobid nagu ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P võivad samuti olla kasulikud. Kuivõrd see on võimalik, tuleks märgis paigutada molekuli kõige stabiilsema(te) osa(de) külge. Uuritava kemikaali puhtus peab olema vähemalt 95 %.

8. Enamik kemikaale tuleks peale kanda eraldi ainena. Taimekaitsevahendite koostises oleva toimeaine seostumise uurimiseks võib kasutada ka valmistoodet, kuid uuritava kemikaali enda uurimine on eriti vajalik siis, kui segu tõenäoliselt mõjutab vabanemiskiirust (nt granuleeritud või toimeaine ohjatud eraldumisega tooted). Seoses konkreetset toodet arvestavate võimalike erinõuetega katse korralduse suhtes võib olla kasulik pidada enne katse tegemist nõu reguleeriva asutusega. Vanandatud jääkide leostumise uuringu puhul tuleks kasutada puhast lähtekemikaali.

9. Enne mullakolonnis leostumise katse tegemist peaks uuritava aine kohta olema kogutud järgmine teave:

   (1) lahustuvus vees [katsemeetod A.6] (13);

   (2) lahustuvus orgaanilistes lahustites;

   (3) aururõhk [katsemeetod A.4] (13) ja/või Henry konstant;

   (4) jaotuskoefitsient süsteemis *n*-oktanool-vesi [katsemeetodid A.8 ja A.24] (13);

   (5) adsorptsioonikoefitsient (K_d, K_f või K_{OC}) [katsemeetodid C.18 ja/või C.19] (13);

   (6) hüdrolüüs [katsemeetod C.7] (13);

   (7) dissotsiatsioonikonstant (pK_a) [OECD katsejuhend 112] (25);

   (8) aeroobne ja anaeroobne muundumine mullas [katsemeetod C.23] (13).

   Märkus: Temperatuur, mille juures mõõtmised tehakse, tuleks esitada vastavas katseprotokollis.

10. Uuritava kemikaali kogus mullakolonnis peaks olema piisav, et võimaldada kindlaks teha vähemalt 0,5 % kasutatud kogusest igas mullasamba osas. Taimekaitsevahendi toimeaine puhul peaks pealekantava uuritava kemikaali kogus vastama suurimale soovitatud kasutamismäärale (üks kasutuskogus).

11. Kättesaadav peab olema sobiv teadaoleva mõõtetäpsuse, kordustäpsusega ja tundlikkusega analüüsimeetod uuritava kemikaali ning vajaduse korral selle muundumissaaduste määramiseks mullas ja nõrgvees. Uuritava kemikaali ja selle oluliste muundumissaaduste (tavaliselt vähemalt kõik muundumissaadused, mida on $\geq$ 10 % uuritava aine kogusest täheldatud muundumisteede uuringutes, kuid eelistatavalt kõik probleemsed muundumissaadused) analüüsi tuvastuspiir peaks olema teada (vt punkt 17).

▼**M6**

VÕRDLUSKEMIKAALID

12. Tuleks kasutada võrdluskemikaale nagu atrasiin või monuroon, mis on välitingimustes teadaolevalt mõõdukad leostujad, ja hinnata uuritava kemikaali suhtelist liikuvust mullas nende suhtes (1, 8, 11). Vee liikumise jälgimiseks mullasambas võib kasutada mitte sorbeeruvat ja mitte lagundatavat polaarset võrdlusainet (nt triitium, bromiid, fluorestseiin, eosiin); see võib aidata ka kinnitada mullakolonni hüdrodünaamilisi omadusi.

13. Mullasamba osades ja nõrgvees leitud muundumissaaduste kirjeldamiseks ja/või kindlakstegemiseks kromatograafiliste, spektroskoopiliste või muude asjakohaste meetoditega võivad olla kasulikud ka analüüsi võrdluskemikaalid.

MÕISTED JA ÜHIKUD

14. Vt lisa 1.

KVALITEEDIKRITEERIUMID

Saagis

15. Mullasamba osades ja kolonni nõrgvees leitud uuritava kemikaali protsendimäärade summa annab leostumiskatse saagise. Saagis peaks olema vahemikus 90–110 % märgistatud kemikaalide puhul (11) ja 70–110 % märgiseta kemikaalide puhul (8).

Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus

16. Uuritava kemikaali ja muundumissaaduste koguste määramise meetodi korratavust saab kontrollida nii, et ühte ja sama mullasamba osa või nõrgvett analüüsitakse kaks korda (vt punkt 11).

17. Uuritava kemikaali ja muundumissaaduste igas mullasamba osas või nõrgvees määramise analüütilise meetodi avastamispiir peaks olema vähemalt 0,01 mg/kg (uuritava kemikaalina) või 0,5 % lisatud kogusest igas mullasamba osas, olenevalt sellest, kumb on madalam. Kvantitatiivse koguse määramispiir tuleks samuti määrata.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Katsesüsteem

18. Katse tegemiseks kasutatakse leostumise uurimise kolonni (osadeks jagatavat või mitte), mis on valmistatud sobivast inertsest materjalist (nt klaas, roostevaba teras, alumiinium, teflon, polüvinüülkloriid jne), mille siseläbimõõt on vähemalt 4 cm ja kõrgus vähemalt 35 cm. Tuleks uurida kolonni materjali selles suhtes, ega sel ei ole mingit koostoimet uuritava kemikaali ega selle muundumissaadustega. Mõned näited osadeks jagatava ja mittejagatava kolonni kohta on esitatud 2. liites.

19. Mullatäidise panemiseks kolonni kasutatakse lusikat, varbkolbi ja vibratsiooniseadet.

20. Mullakolonni niisutamiseks kunstliku vihmaga kasutatakse kolb- või peristaltilist pumpa, dušiotsikut, Mariotte'i pudelit või lihtsat tilklehtrit.

▼M6

Laboriseadmed ja kemikaalid

21. Vaja on harilikku laborivarustust, eeskätt järgmisi vahendeid:

(1) analüüsiseadmed, nagu GLC-, HPLC- ja TLC-seadmed, kaasa arvatud vajalikud detekteerimisseadmed radioaktiivse märgisega ja märgiseta kemikaalide määramiseks või pööratud isotooplahjendusmeetodi kasutamiseks;

(2) seadmed identifitseerimise jaoks (nt MS, GC-MS, HPLC-MS, TMR jne);

(3) vedelik-stsintillatsiooniloendaja radioaktiivse märgisega uuritava kemikaali puhul;

(4) oksüdeerija märgisega materjali põletamiseks;

(5) ekstraheerimisseade (nt tsentrifuugiküvetid külmekstraheerimiseks ja Soxhlet'i seade pidevekstraheerimiseks tagasijooksuga);

(6) seadmed lahuste ja ekstraktide kontsentreerimiseks (nt rotaatoraurusti).

22. Kasutatavad kemikaalid hõlmavad järgmist: orgaanilised lahustid, analüütiliselt puhtad, nt atsetoon, metanool jt; stsintillatsioonivedelik; 0,01 M $CaCl_2$ lahus destilleeritud või deioniseeritud vees (nn kunstlik vihm).

Uuritav kemikaal

23. Mullakolonnile kandmiseks tuleks uuritav kemikaal lahustada deioniseeritud või destilleeritud vees. Kui uuritav kemikaal on vees halvasti lahustuv, võib seda kolonnile kanda valmistootena (vajaduse korral pärast vees suspendeerimist või emulgeerimist) või mõnes orgaanilises lahustis. Kui kasutatakse orgaanilist lahustit, peaks selle kogus olema minimaalne ning see tuleks mulla pinnalt aurustada enne kolonni voolutamise algust. Tahked tooted nagu graanulid tuleks kolonnile kanda tahkel kujul ilma veeta; toodet võib enne kasutamist segada väikse koguse (nt 1 g) kvartsliivaga, et tagada selle ühtlasem jaotumine mullakolonni pinnal.

24. Uuritava kemikaali kogus mullakolonnis peaks olema piisav, et võimaldada kindlaks teha vähemalt 0,5 % kasutatud kogusest igas mullasamba osas. Taimekaitsevahendite toimeainete puhul võib lähtuda soovitatavast kasutamismäärast (üks kasutuskogus) ning nii lähteühendi kui ka vanandatud ühendi leostamine peab olema vastavuses kasutatava mullakolonni pindalaga ([1]).

Võrdluskemikaal

25. Leostumiskatse tegemisel tuleks kasutada võrdluskemikaali (vt punkt 12). See tuleks kanda mullakolonni pinnale samal viisil kui uuritav kemikaal ja

([1]) Koguse, mis tuleb kanda silindrilisele mullakolonnile, saab arvutada järgmise valemi abil:

$$M\,[\mu g] = \frac{A\,[kg/ha] \cdot 10^9[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8[cm^2/ha] \cdot 4}$$

kus:
M = mullakolonnile kantav kogus [µg]
A = kasutamismäär [kg/ha]
d = mullakolonni diameeter [cm]
π = 3,14

▼M6

sobival määral, mis võimaldab seda korralikult tuvastada kas samas mullakolonnis koos uuritava kemikaaliga kasutatava sisestandardina või eraldi kolonnis. Eelistada tuleb mõlema kemikaali voolutamist samas kolonnis, välja arvatud juhul, kui kemikaalid on sarnase märgisega.

Mullad

Muldade valimine

26. Leostumisuuringutes tuleks ühe uuritava lähtekemikaali puhul kasutada 3–4 mulda, millel on erinev pH, orgaanilise süsiniku sisaldus ja tekstuur (12). Juhised leostumiskatsete jaoks muldade valimiseks on esitatud tabelis 1. Ioniseeritava uuritava aine puhul peavad väljavalitud mullad hõlmama laia pH-vahemikku, et oleks võimalik hinnata aine liikuvust ioniseeritud ja ioniseerimata vormis; vähemalt kolme mulla pH peaks olema selline, mille juures uuritav kemikaal on liikuvas vormis.

Tabel 1.

Leostumisuuringute jaoks muldade valimise juhend

Mulla nr	pH	Orgaaniline süsinik %	Savisisaldus %	Tekstuur (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	raske liivsavi
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	tolmjas liivsavi
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	keskmine liivsavi
4	< 4,0–6,0 §	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 #	saviliiv
5	< 4,5	> 10 §	< 10	saviliiv/liiv

(*) Vastavalt FAO ja Ameerika Ühendriikide põllumajandusministeeriumi süsteemile (14).

§ Vastavad muutujad peaksid eelistatavalt jääma esitatud vahemikku. Kui sobivat mullamaterjali on siiski raske leida, aktsepteeritakse ka märgitud miinimumist väiksemaid väärtusi.

‡ Mullad, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on alla 0,3 %, võivad häirida orgaanilise aine sisalduse ja adsorptsiooni vahelist korrelatsiooni. Seepärast on soovitatav kasutada muldasid, mille minimaalne orgaanilise süsiniku sisaldus on 0,3 %.

Väga kõrge süsinikusisaldusega (nt > 10 %) muld ei pruugi olla seaduslikult vastuvõetav nt pestitsiidide registreerimisel.

27. Mõnikord võib olla vaja uurida muid mullatüüpe, mis esindaksid jaheda või parasvöötme kliimaga või troopilisi piirkondi. Seepärast juhul, kui eelistatakse teisi mullatüüpe, tuleks neid iseloomustada samade parameetritega ja neil peaks olema samalaadne omaduste varieeruvus, nagu on kirjeldatud leostumiskatsete jaoks muldade valimise juhistes (vt tabel 1), isegi kui need mullad ei vasta täpselt nendele kriteeriumidele.

28. Leostumiskatse tegemisel vanandatud jääkidega tuleks kasutada ühte mulda (12). Selle liivasisaldus peaks olema > 70 % ja orgaanilise süsiniku sisaldus vahemikus 0,5–1,5 % (nt muld nr 4 tabelis 1). Suurema arvu mullatüüpide kasutamine võib olla vajalik siis, kui teave muundumissaaduste kohta on oluline.

29. Kõiki muldasid tuleks iseloomustada vähemalt nende tekstuuri (liiva-, tolmu- ja saviprotsent vastavalt FAO ja USDA klassifikatsioonile (14)), pH, katioonivahetusvõime, orgaanilise süsiniku sisalduse, mulla lasuvustiheduse (häiritud muld) ja veemahutavuse järgi. Mikroobide biomassi mõõtmine on

▼M6

nõutav ainult sellise mulla puhul, mida kasutatakse vanandamis-/inkubeerimisaja jooksul enne leostumiskatse tegemist vanandatud uuritava ainega. Täiendav teave mulla omaduste kohta (nt mulla klassifikatsioon, savi mineraloogia, eripind) võib olla kasulik katse tulemuste tõlgendamise puhul. Mulla omaduste määramiseks saab kasutada viidetes (15, 16, 17, 18, 19) soovitatud meetodeid.

Muldade kogumine ja säilitamine

30. Muld tuleks võtta ülemisest kihist (A-horisondist) kuni 20 cm sügavuselt. Taimestiku ja makrofauna jäägid ning kivid tuleks eemaldada. Mullad (välja arvatud uuritava kemikaali vanandamiseks kasutatavad mullad) kuivatatakse õhu käes toatemperatuuril (eelistatavalt vahemikus 20–25 °C). Kogused tuleks murendada võimalikult ettevaatlikult, nii et mulla struktuur muutuks võimalikult vähe. Muld sõelutakse läbi sõela avaga ≤ 2 mm. Soovitatakse hoolikat homogeniseerimist, sest see suurendab tulemuste korratavust. Enne kasutamist võib mulda hoida toatemperatuuril ja õhu käes kuivatatuna (12). Säilitamisaega ei piirata, kuid üle kolme aasta säilitatud mulda tuleks enne kasutamist uuesti analüüsida orgaanilise süsiniku sisalduse ja pH suhtes.

31. Üksikasjalik teave mullaproovide kogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjad hõlmavad järgmist: täpne asukoht [näidatakse täpselt vastavalt UTM-ile (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) või geograafiliste koordinaatide abil], taimkate, töötlemine põllukultuure kaitsvate kemikaalidega, väetamine orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine (12). Kui mulda on juba töödeldud uuritava ainega või selle struktuursete analoogidega viimase nelja aasta jooksul, ei tuleks seda leostumisuuringus kasutada.

Katsetingimused

32. Katse ajal tuleks mullaga leostumiskolonne hoida pimedas toatemperatuuril, kui see temperatuur püsib vahemikus ± 2 °C. Soovitatavad temperatuurid on vahemikus 18–25 °C.

33. Kunstlikku vihma (0,01 M $CaCl_2$) tuleks lisada pidevalt mullasamba pinnale kiirusega 200 mm 48 tunni jooksul ([1]); See kiirus vastab 251 ml lahuse lisamisele, kui kolonni siseläbimõõt on 4 cm. Kui katse eesmärk seda nõuab, võib lisaks kasutada muid kunstliku vihma kiirusi ja pikemat katse kestust,

Katse käik

Uuritava lähtekemikaali leostumine

34. Vähemalt kaks leostumiskolonni täidetakse töötlemata, õhu käes kuivatatud ja sõelutud (< 2 mm) mullaga kuni kõrguseni ligikaudu 30 cm. Ühtlase täitmise saavutamiseks lisatakse mulda kolonni väikeste portsjonitena ja surutakse kokku varbkolviga; samas vibreeritakse kolonni kergelt, kuni

([1]) See modelleerib väga suurt vihmasadu. Keskmine sademete hulk näiteks Kesk-Euroopas on 800–1 000 mm aastas.

▼M6

kolonni ülemine kiht rohkem enam kokku ei vaju. Ühetaoline täitmine on vajalik selleks, et leostumiskolonnidega saada korratavaid tulemusi. Kolonni täitmise tehnika kohta vt viited (20, 21 ja 22). Kolonni täitmise korratavuse kontrollimiseks mõõdetakse kolonni pandud mulla kogumass ([1]); paralleelkolonnide massid peaksid olema sarnased.

35. Pärast täitmist kolonnid eelniisutatakse kunstliku vihmaveega (0,01 M $CaCl_2$ lahus) altpoolt ülespoole, et asendada õhk mulla poorides veega. Seejärel lastakse mullakolonnidel tasakaalustuda ja liigne vesi vajub raskusjõu toimel välja. Vt ülevaade kolonni küllastamismeetoditest, viide (23).

36. Seejärel kantakse mullakolonnile uuritav kemikaal ja/või võrdluskemikaal (vt ka punktid 23–25). Ühtlase jaotuse saamiseks kantakse uuritava kemikaali ja/või võrdluskemikaali lahused, suspensioonid või emulsioonid ühtlaselt kogu mullasamba pinnale. Kui uuritava kemikaali pealekandmiseks on soovitatud selle segamist mulda, tuleks kemikaal segada väikse koguse (nt 20 g) mullaga ja kanda see mullasamba pinnale.

37. Mullasamba pind kaetakse seejärel paagutatud klaasfiltriketta, klaashelmeste, klaaskiudfiltri või filterpaberikettaga, et jaotada kunstlikku vihma ühtlaselt üle kogu kolonni pinna ja vältida mullapinna häirimist vihmatilkadega. Mida suurem on kolonni läbimõõt, seda hoolikam tuleb olla kunstliku vihma kolonnile juhtimisega, et tagada vihma ühtlane jaotumine kogu kolonni pinnal. Seejärel lisatakse mullakolonnidele kunstlikku vihma tilkhaaval kolb- või peristaltilise pumba või tilklehtri abil. Eelistatavalt tuleks nõrgvett koguda fraktsioonidena ja märkida üles nende kogused ([2]).

38. Pärast kolonnide voolutamist ja nõrguda laskmist jagatakse kolonnid nõutavaks arvuks osadeks, olenevalt sellest, millist teavet tahetakse katsega saada, osasid ekstraheeritakse sobivate lahustite või lahustisegudega ja määratakse nendes uuritav aine või vajaduse korral muundumissaadused, üldradioaktiivsus ja võrdlusaine. Nõrgvett või nõrgveefraktsioone analüüsitakse otse või pärast ekstraheerimist, et määrata nendes samad ained. Kui kasutatakse radioaktiivse märgisega uuritavat kemikaali, tuleb määrata kõik fraktsioonid, mis sisaldavad ≥ 10 % kolonnile kantud radioaktiivsusest.

Vanandatud jääkide leostumine

39. Värskele mullale (mida ei ole eelnevalt õhu käes kuivatatud) lisatakse radioaktiivse märgisega uuritavat kemikaali sellises koguses, mis vastab mullakolonni pindalale (vt punkt 24), ja inkubeeritakse aeroobsetes tingimustes vastavalt katsemeetodile C.23 (13). Inkubeerimise (vanandamise) aeg peaks

([1]) Häiritud muldade näidistihedused on järgmised:liiv 1,66 g/ml
keskmine liivsavi 1,17 g/ml
saviliiv 1,58 g/ml
tolmmuld 1,11 g/ml

([2]) Tüüpiline nõrgvee maht on vahemikus 230–260 ml, mis vastab ligikaudu 92–104 % kogu kunstliku vihma mahust (251 ml), kui kasutatakse mullakolonni, mille läbimõõt on 4 cm ja pikkus 30 cm.

▼M6

olema piisavalt pikk, et tekiks olulisel määral muundumissaadusi; uuritava kemikaali soovitatav vanandamisaeg on selle kemikaali üks poolestusaeg, ([1]) kuid mitte üle 120 päeva. Enne leostamist määratakse vanandatud mullas uuritava kemikaali ja selle muundumissaaduste sisaldus.

40. Leostumiskolonnid täidetakse kuni 28 cm kõrguseni samasuguse (kuid õhu käes kuivatatud) mullaga, mida kasutati punktis 34 kirjeldatud vanandamise katses, ja määratakse täidisega mullakolonni kogumass. Seejärel mullakolonnid eelniisutatakse, nagu on kirjeldatud punktis 35.

41. Seejärel kantakse mullakolonni pinnale 2 cm paksuse kihina vanandatud mulla jääkidena uuritav kemikaal ja selle jäägid (muundumissaadused) (vt punkt 39). Mullakolonni maksimaalne kõrgus (töötlemata muld pluss vanandatud muld) ei tohiks eelistatavalt olla üle 30 cm (vt punkt 34).

42. Leostumiskatse tehakse vastavalt punktis 37 esitatud kirjeldusele.

43. Pärast leostumist määratakse mullasamba osades ja nõrgvees vastavalt punktis 38 esitatud kirjeldusele uuritav kemikaal, selle muundumissaadused ja ekstraheerumata radioaktiivsus. Selleks et määrata, kui suur osa vanandamisjääkidest jääb pärast leostumist 2 cm paksusesse pinnakihti, tuleks see mullasamba osa analüüsida eraldi.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

44. Iga mullasambaosa ja nõrgveefraktsiooni kohta tuleks esitada uuritava kemikaali, muundumissaaduste, ekstraheerumatute ainete ja, kui lisati, võrdluskemikaali kogused protsentidena pealekantud annusest. Iga kolonni kohta esitatakse graafiliselt nende protsendimäärad funktsioonina mullasamba sügavusest.

45. Kui kolonniga leostumise uuringus lisatakse ka võrdlusaine, saab uuritava kemikaali leostumist hinnata suhtelises skaalas, kasutades suhtelisi liikuvustegureid (*relative mobility factor*, RMF; määratlus vt 3. liide) (1, 11), mis võimaldab võrrelda mitmesuguste kemikaalide leostumisandmeid, mis on saadud erinevate mullatüüpidega. Mitmete taimekaitsevahendite RMFi väärtuste näited on esitatud 3. lisas.

46. Kolonnist leostumise katsega võib hinnata ka K_{oc} (orgaanilise süsiniku normeeritud adsorptsioonikoefitsiendi) ja K_{om} (orgaanilise süsiniku normeeritud jaotuskoefitsiendi) väärtusi, kui kasutada keskmisi leostumisvahemaid või leitud korrelatsioone RMFi ja K_{OM} või K_{OC} vahel (4) või lihtsat kromatograafiateooriat (24). Siiski tuleks viimast meetodit kasutada ettevaatusega, arvestades eelkõige, et leostumisprotsessis ei ole küllastunud voolamise tingimusi, pigem on tegu küllastumata süsteemidega.

([1]) Mullas võib tekkida lisaks ühele peamisele muundumissaadusele veel muidki muundumissaadusi, mis võivad muundumiskatse käigus tekkida eri aegadel. Sellisel juhul võib olla vajalik teha leostumiskatse erineva vanuseni vanandatud jääkidega.

▼M6

Tulemuste tõlgendamine

47. Käesolevas meetodis kirjeldatud kolonnis leostumise uuringud võimaldavad määrata uuritava kemikaali (lähteaine) ja/või selle muundumissaaduste (vanandatud jääkide) leostumist või liikuvust mullas. Need katsed ei võimalda kvantitatiivselt prognoosida leostumist välitingimustes, kuid neid võib kasutada selleks, et võrrelda ühe kemikaali „leostuvust" muude kemikaalide omaga, mille leostumiskäitumine võib olla teada (24). Samuti ei mõõdeta nende katsetega kvantitatiivselt uuritava kemikaali protsentuaalset kogust, mis võib jõuda põhjavette (11). Siiski võib kolonnis leostumise katse tulemus aidata otsustada, kas on vaja täiendavaid välioludele lähendatud või välikatseid kemikaalide puhul, mis on laborikatsetes näidanud suurt liikuvusvõimet.

Katseprotokoll

48. Katseprotokollis tuleb esitada järgmine:

Uuritav kemikaal ja võrdluskemikaal (kui seda kasutatakse):

— tavanimetus, keemiline nimetus (IUPACi ja CASi nomenklatuur), CASi number, keemiline struktuur (milles on näidatud märgise asukoht, kui kasutatakse radioaktiivse märgisega materjali) ja olulised füüsikalis-keemilised omadused;

— uuritava kemikaali puhtus (lisandid).

— märgisega kemikaalide radiokeemiline puhtusaste ja eriaktiivsus (vajaduse korral).

Katsemullad:

— üksikasjalikud andmed kogumiskoha koha;

— mulla omadused, nt pH, orgaanilise süsiniku ja savi sisaldus, tekstuur ja lasuvustihedus (häiritud mulla korral);

— mulla mikroobne aktiivsus (ainult mulla puhul, mida kasutatakse uuritava kemikaali vanandamiseks);

— mullaproovide säilitamise kestus ja tingimused.

Katsetingimused:

— uuringu kuupäevad;

— leostumiskolonnide pikkus ja läbimõõt;

— mullakolonnides oleva mulla üldmass;

— uuritava kemikaali ja vajaduse korral võrdluskemikaali kogus;

— kunstliku vihma kogus, vihmutamise sagedus ja kestus;

— katsesüsteemi temperatuur;

— paralleelkatsete arv (vähemalt kaks);

— meetodid uuritava kemikaali, muundumissaaduste ja vajaduse korral võrdluskemikaali määramiseks mullasamba osades ja nõrgvees;

— meetodid uuritava kemikaali ja muundumissaaduste kindlakstegemiseks ja iseloomustamiseks mullasamba osades ja nõrgvees.

▼**M6**

Katsetulemused:

— tulemused tabeli kujul, väljendatuna kontsentratsioonidena ja protsendina lähteannusest mullasamba osades ja nõrgvees;

— massibilanss, kui see on asjakohane;

— nõrgvee kogused;

— leostumisvahemaad ja, kui see on asjakohane, suhtelised liikuvustegurid;

— graafik, milline % leiti mullasamba osas funktsioonina osa sügavusest;

— tulemuste arutelu ja tõlgendamine.

KIRJANDUS

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) Komisjoni direktiiv 95/36/EÜ, 14. juuli 1995, millega muudetakse nõukogu direktiivi 91/414/EMÜ taimekaitsevahendite turuleviimise kohta, I lisa, EÜT L 172, 22.7.1995, lk 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in sou, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/-Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(13) Käesoleva lisa järgmised peatükid:

Peatükk A.4. Aururõhk

Peatükk A.6. Lahustuvus vees

▼**M6**

Peatükk A.8. Jaotustegur. Loksutamismeetod

Peatükk A.24 Jaotuskoefitsient, HPLC meetod

Peatükk C.7. Lagunemine – abiootiline lagunemine: hüdrolüüsi sõltuvus pHst

Peatükk C.18. Adsorptsioon/desorptsioon, kasutades partii tasakaalustamise meetodit

Peatükk C.23. Aeroobne ja anaeroobne transformatsioon mullas

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼M6

1. liide

Mõisted ja ühikud

Jäägid vanandatud mullas – uuritav kemikaal ja muundumissaadused pinnases pärast kemikaali pinnasesse kandmist ja aega, mis on olnud piisavalt pikk kemikaali liikumise, adsorptsiooni, metaboliseerimise ja hajumise jaoks, mis on muutnud kemikaali jaotumist ja keemilist olemust (1).

Kunstlik vihm – 0,01 M $CaCl_2$ lahus destilleeritud või deioniseeritud vees.

Keskmine leostumisvahemaa – selle mullasambaosa põhi, milles summaarne taasleitud kemikaalisisaldus on 50 % taasleitud kemikaali üldsisaldusest [tavaline leostumiskatse], või (selle mullasambaosa põhi, milles summaarne taasleitud kemikaalisisaldus on 50 % taasleitud kemikaali üldsisaldusest) – ((vanandatud jääkidega pinnasekihi paksus)/2) [vanandatud jääkide leostumise katse].

Kemikaal – aine või segu.

Nõrgvesi – veefaas, mis on läbinud mullaprofiili või mullakolonni (1).

Leostumine – protsess, mille käigus kemikaal liigub allapoole läbi mullaprofiili või mullakolonni (1).

Leostumisvahemaa – sügavaim mullasambaosa, milles pärast leostumisprotsessi leiti ≥ 0,5 % pealekantud uuritavast kemikaalist või vanandatud jääkidest (sama kui sissetungimise sügavus).

Avastamispiir ja määramispiir – avastamispiir on kemikaali kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa kemikaali identsust tõendavat signaali eristada analüüsi artefaktidest. Määramispiir on kemikaali kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa kontsentratsiooni määrata nõutava täpsusega.

Suhteline liikuvustegur (RMF) – (uuritava kemikaali leostumisvahemaa (cm)) / (võrdluskemikaali leostumisvahemaa (cm))

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil

Muundumissaadus – iga kemikaal, mis on tekkinud uuritava kemikaali biootiliste või abiootiliste muundumisreaktsioonide tulemusel, kaasa arvatud CO_2 ja saadused, mis on seotud jääkides.

Muld – mineraalsete ja orgaaniliste keemiliste koostisainete segu; orgaanilised koostisained sisaldavad suure süsiniku- ja lämmastikusisalduse ning suure molekulmassiga ühendeid, milles elavad väiksed (enamasti mikro-)organismid. Mulla puhul võib eristada kahte olekut:

— looduspärane, nagu see on aja jooksul tekkinud, mitmesuguste mullatüüpide iseloomulike kihtidega;

— häiritud, nagu see tavaliselt esineb haritavatel aladel või labidaga kaevatud proovides, mis on võetud käesoleva katsemeetodi kohaste katsete tegemiseks (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

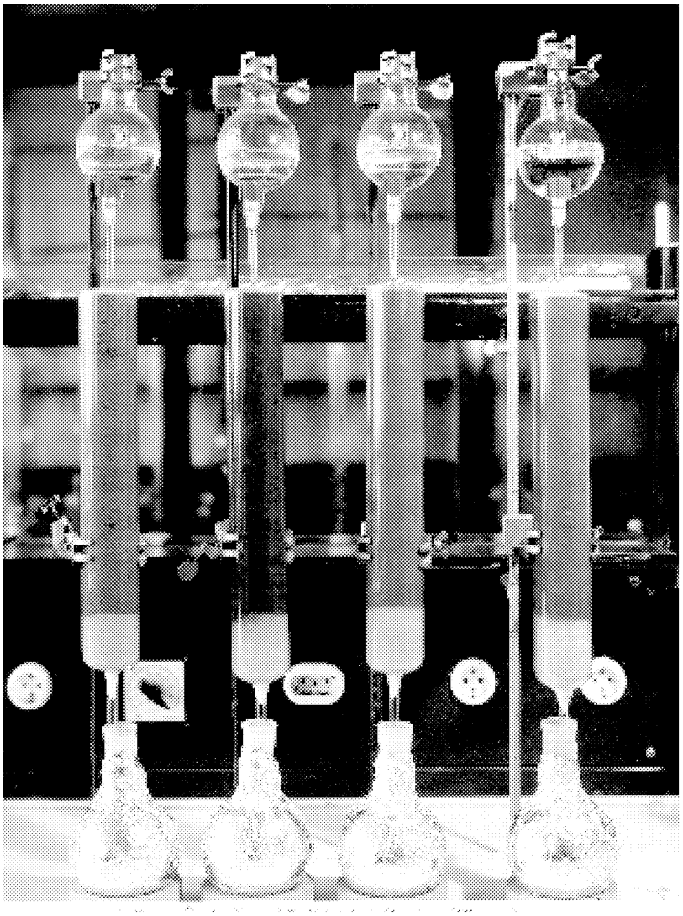
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼**M6**

2. liide

Joonis 1.

Osadeks mitte lahtivõetava klaasist leostumiskolonni näidis; pikkus 35 cm, siseläbimõõt 5 cm (1)



← Tilklehtrid kunstliku vihma lisamiseks

← Paagutatud klaasketas, mulla pinna häirimise vältimiseks ja kunstliku vihma ühtlaseks jaotamiseks

← Klaaskolonn, mis on täidetud katseks võetud mullaga (kui uuritakse valgustundlikke kemikaale, tuleb kolonni ümber mähkida alumiinium-foolium)

← Kvartsliiva kiht

← Klaaskiudtropp, mis hoiab mulda kolonnis

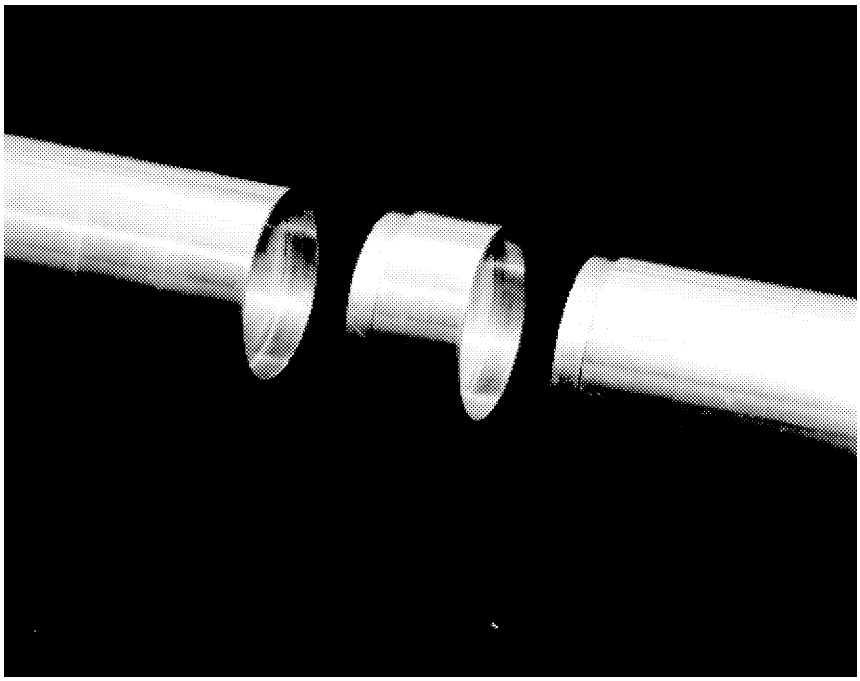
← Ümara põhjaga kolb nõrgvee kogumiseks; fotolüüsi vältimiseks mähitud alumiiniumfooliumi sisse

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

Joonis 2.

Osadeks lahtivõetava metallkolonni näidis; kolonni siseläbimõõt on 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼**M6**

3. liide

Suhtelise liikuvusteguri (RMF) (*) näiteid eri taimekaitsevahendite puhul (1, 2) ja vastavad liikuvusklassid +

RMFi vahemik	Kemikaal (RMF)	Liikuvusklass
≤ 0,15	Paratioon (< 0,15), flurodifeen (0,15)	I liikumatu
0,15–0,8	Profenofoss (0,18), propikonasool (0,23), diasinoon (0,28), diuroon (0,38), terbutüülasiin (0,52), metidatioon (0,56), prometriin (0,59), propasiin (0,64), alakloor (0,66), metolakloor (0,68)	II veidi liikuv
0,8–1,3	Monuroon (**) (1,00), atrasiin (1,03), simasiin (1,04), fluometuroon (1,18)	III mõõdukalt liikuv
1,3–2,5	Prometoon (1,67), tsüanasiin (1,85), bromatsiil (1,91), karbutilaat (1,98)	IV suhteliselt liikuv
2,5–5,0	Karbofuraan (3,00), dioksakarb (4,33)	V liikuv
> 5,0	Monokrotofoss (> 5,0), dikrotofoss (> 5,0)	VI väga liikuv

(*) Suhteline liikuvustegur on leitud järgmiselt (3):

$$\mathrm{RMF} = \frac{\text{uuritava kemikaali leostumisvahemaa(cm)}}{\text{võrdluskemikaali leostumisvahemaa(cm)}}$$

(**) Võrdluskemikaal

\+ Muud kemikaalide mullas liikuvuse klassifitseerimise süsteemid põhinevad mulla õhukese kihi kromatograafia \big(4) abil leitud R_f väärtustel ja K_{oc} väärtustel (5, 6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.” Canterbury, UK, 1-3 July 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼M6

C.45. **PUIDUKONSERVANDIGA TÖÖDELDUD PUIDUST KESKKONDA ERALDUVATE HEITKOGUSTE MÄÄRAMINE. LABORATOORNE MEETOD HEITE MÄÄRAMISEKS KATMATA PUIDUST, MIS ON KOKKUPUUTES MAGEVEE VÕI MEREVEEGA**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 313 (2007). Puidukonservandiga töödeldud puidust keskkonda eralduvat heidet on vaja mõõta, et oleks võimalik hinnata töödeldud puidu keskkonnariske. Käesolevas juhendis kirjeldatakse laborimeetodit heite hindamiseks töödeldud puidust kahes olukorras, kus heide võib sattuda keskkonda:

— heide töödeldud puidust, mis on kokkupuutes mageveega. Töödeldud puidu pinnalt võib puidukonservant sattuda vette;

— heide töödeldud puidust, mis on kokkupuutes mereveega. Töödeldud puidu pinnalt võib puidukonservant sattuda merevette.

2. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on uurida heidet puidust ja puitesemetest, mis ei ole muu materjaliga kaetud ja on kokkupuutes magevee või mereveega. Kasutamisklasse kasutatakse rahvusvaheliselt selleks, et kategoriseerida bioloogilisi ohte, millega puutub kokku töödeldud puitese. Kasutamisklassid võimaldavad määratleda samuti olukorda, milles kasutatakse töödeldud puitesemeid, ja keskkonna osi (õhk, vesi, pinnas), mida puidukonservandiga töödeldud puit võib ohustada.

3. Käesolev katsemeetod on laborimeetod, milles töödeldud puiduga kokkupuutes olevast veest (heitekeskkonnast) võetakse üha pikema kokkupuute ajavahemiku järel proove. Heite kogus heitekeskkonnas on seotud puiteseme pindala ja kokkupuute kestusega, millest saab hinnata heitevoogu ühikutes mg/m^2/päev. Niimoodi saab hinnata heitevoogu (leostumiskiirust) pärast pikemaid kokkupuuteaegu.

4. Heite kogust võib kasutada töödeldud puidu keskkonnariski hindamiseks.

LÄHTEKAALUTLUSED

5. Eeldatakse, et puidu pinnalt konservandi leostumise mehhanism ja intensiivsus ei tarvitse olla magevees samasugune kui merevees. Seega on puidu töötlemiseks kasutatavate konservantide ja segude puhul, mida kasutatakse merevee keskkonnas oleva puidu puhul, vaja uurida leostumist merevees.

6. Puit, mida on töödeldud puidukonservandiga, peab kaubanduslikult kättesaadava puidu suhtes olema esindav. See peaks olema töödeldud vastavalt konservandi tootja juhistele, asjakohastele normidele ja spetsifikatsioonidele. Puit peab pärast töötlemist ja enne katse algust olema konditsioneeritud; tuleb teatada selle konditsioneerimise tingimused.

7. Kasutatavad puidu näidised peavad olema kaubanduslike toodete suhtes esindavad (nt puidu liik, tihedus ja muud omadused).

▼M6

8. Katset võib kasutada puidu puhul, mida on töödeldud immutamisega või millele konservant on pinnale kantud, samuti töödeldud puidu puhul, mille pinda on kohustuslikus korras täiendavalt töödeldud (näiteks värvitud kaubandusliku kasutuse puhul nõutavas korras).

9. Vee koostis, kogus, pH ja füüsikaline olek on olulised puidust leostuva heite koguse, sisalduse ja laadi määramiseks.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

10. Puidukonservandiga töödeldud katsekehad sukeldatakse vette. Kokkupuuteaja jooksul võetakse mitmesuguste ajavahemike järel nii palju proove veest (heitekeskkond) ja analüüsitakse neid, et piisaks statistiliste arvutuste tegemiseks. Analüüsitulemustest arvutatakse heite kiirus ühikutes mg/m^2/päev. Proovivõtuajad tuleks registreerida. Katse töötlemata näidistega võib lõpetada, kui esimese kolme andmepunkti puhul ei leita mingit tausta.

11. Töötlemata puidunäidiste lisamine katsesse võimaldab määrata ka muude heiteainete kui kasutatud puidukonservantide heite taustkontsentratsioonid.

KVALITEEDIKRITEERIUMID

Täpsus

12. Heite hindamise meetodi täpsus sõltub analüüsitavatest tootenäidistest – kuivõrd hästi esindavad need kaubanduslikku töödeldud puitu, sellest, kuivõrd hästi esindab vesi tegelikku vett ja kokkupuuterežiim – tegelikke looduslikke tingimusi.

13. Analüüsimeetodi mõõtetäpsus, kordustäpsus ja korratavus tuleks määrata enne katse tegemist.

Korratavus

14. Võetakse kolm proovi veest, analüüsitakse need ja leitakse heite väärtuse keskväärtus. Tulemuste korratavus ühes laboris ja eri laborites sõltub immutamisrežiimist ja puidust, mida kasutatakse katsekehade valmistamiseks.

Tulemuste lubatav vahemik

15. Vastuvõetav on tulemuste vahemik, milles kõrgeimad ja madalaimad tulemused erinevad vähem kui üks suurusjärk.

KATSETINGIMUSED

Vesi

16. Magedasse vette leostumise stsenaariumid: Puidust magedasse vette leostumise uurimiseks soovitatakse kasutada deioniseeritud vett (nt ASTM D 1193 tüüp II). Vee temperatuur peab olema 20 ± 2 °C ning mõõdetud pH ja temperatuur registreeritakse katseprotokollis. Veeproovidest, mis on võetud enne töödeldud puidu katsekehade viimist vette, saab määrata analüüsitavate kemikaalide (taust-)sisalduse vees. See on kontroll, millega määratakse analüüsitavate kemikaalide taustnivoo.

▼M6

17. Merevette leostumise stsenaariumid: Puidust merevette leostumise uurimiseks soovitatakse kasutada sünteetilist merevett (nt ASTM D 1141 asendusmerevesi ilma raskmetallideta). Vee temperatuur peab olema 20 ± 2 °C ning mõõdetud pH ja temperatuur registreeritakse katseprotokollis. Veeproovidest, mis on võetud enne töödeldud puidu katsekehade viimist vette, saab määrata analüüsitavate kemikaalide sisalduse vees. Tegemist on analüüsi kontrollkatsega, millega määratakse oluliste kemikaalide taustsisaldus.

Puidust katsekehad

18. Puuliik peab olema tüüpiline selliste puuliikide jaoks, mida kasutatakse puidukonservantide tõhususe kontrollimiseks. Soovitatavad liigid on *Pinus sylvestris* L. (harilik mänd), *Pinus resinosa* Ait. (vaigumänd) või *Pinus* spp (lõunamänd). Täiendavaid katseid võib teha muude liikidega.

19. Kasutada tuleks sirge süüga puitu, milles ei oleks oksakohti. Vaiguse välimusega materjali tuleks vältida. Puit peab olema kaubanduslikult kättesaadava puidu jaoks esindav. Protokolli tuleks kanda puidu allikas, tihedus ja aastaringide tihedus 10 mm kohta.

20. Puitkatsekehade komplektiks soovitatakse võtta viis standardile EN 113 vastava suurusega klotsi (mõõtmed 25 mm × 50 mm × 15 mm), kus pikikülg on paralleelne süüga, kuigi võib kasutada ka muude mõõtmetega katsekehasid, näiteks 50 mm × 150 mm × 10 mm. Katsekehad tuleb täielikult sukeldada vette. Katsekehad peaksid 100 % ulatuses koosnema maltspuidust. Iga katsekeha on märgistatud nii, et seda oleks võimalik kindlaks teha kogu katse jooksul.

21. Kõik katsekehad peaksid olema hööveldatud või saetud ja pinnad ei tohi olla lihvitud.

22. Puitkatsekehasid võetakse analüüsi tegemiseks vähemalt viis komplekti: kolm katsekehade komplekti töödeldakse puidukonservandiga, üks komplekt on töötlemata ja üht komplekt kasutatakse selleks, et hinnata katsekehade niiskusesisaldust pärast ahjus kuivatamist ja enne töötlemist. Valmistatakse ette piisav arv katsekehasid, et nendest saaks valida kolm katsekehakomplekti, milles seotud puidukonservandi kogused oleksid keskväärtuse suhtes 5 % vahemikus.

23. Kõikide katsekehade otsad on kaetud (suletud) kemikaaliga, mis ei lase puidukonservandil imbuda katsekeha otsast puusüü sisse ega lase konservandil leostuda katsekeha otsa süü kaudu. Otsa sulgeva vahendi pealekandmisel on vaja eristada katsekehasid, millele konservant kantakse pinnale, katsekehadest, millesse konservandil lastakse sisse imbuda. Otsa sulgev vahend tuleb katsekehale kanda enne töötlemist puidukonservandiga ainult juhul, kui konservant kantakse pinnale.

24. Katsekeha otsa süü peab olema avatud, kui töötlemisel lastakse konservandil imbuda puidu sisse. Seepärast tuleb selliste katsekehade otsad sulgeda alles konditsioneerimisperioodi lõpus. Hinnatakse üksnes heidet, mis toimub läbi pikisüülise pinna. Suletud otsi katvat kihti tuleks kontrollida ja vajaduse korral see uuesti peale kanda, enne kui alustatakse leostumist; seda ei tohiks uuesti peale kanda pärast leostumise alustamist.

▼M6

Mahuti katsekehade sukeldamiseks

25. Mahuti on tehtud inertsest materjalist ja on piisavalt suur, et mahutada viis EN113 mõõdus puitkatsekeha 500 ml vees, mille pindala suhe mahusse on 0,4 cm^2/ml.

Katsekehade hoidja

26. Katsekehade komplekt pannakse hoidjale, mis võimaldab katsekehade kõigil avatud pindadel olla kokkupuutes veega.

PUIDUKONSERVANDIGA TÖÖTLEMISE KÄIK

Töödeldud katsekehade ettevalmistamine

27. Puitkatsekeha töödeldakse uuritava konservandiga vastavalt kõnealuse toote puhul ettenähtud töötlemismeetodile, mis võib olla konservandiga immutamisel põhinev protsess või katsekeha pinnale kandmine kas tootesse kastmise, toote pihustamise või pintsliga pealekandmise abil.

Konservandid, millega töötlemine põhineb puidu immutamisel

28. Valmistatakse konservandi lahus, millega immutamise tulemusel saavutatakse toote ettenähtud sidumine või peetumine puidus. Puitkatsekeha kaalutakse ja võetakse selle mõõdud. Immutamine peab toimuma vastavalt puidu konservandiga töötlemise kirjeldusele kasutusklassi 4 või 5 puhul. Katsekeha kaalutakse uuesti pärast töötlemist ja konservandi peetumine (kg/m^3) puidus arvutatakse järgmise valemi abil:

$$\frac{\text{mass pärast töötlust(kg)} - \text{mass enne töötlust(kg)}}{\text{katsekeha ruumala}(m^3)} \times \frac{\text{lahuse kontsentratsioon(\% mass/mass)}}{100}$$

29. Katses võib kasutada ka tööstuslikult \big(nt vaakuumsurveimmutuse meetodiga) töödeldud puitu. Kõik toimingud tuleb registreerida protokollis ning konservandi peetumine sellel viisil töödeldud puidus tuleb välja selgitada ja kanda protokolli.

Konservandid, millega töötlemine põhineb toote kandmisel puidu pinnale

30. Puitkatsekehade pinna töötlemine hõlmab tootesse kastmist, toote pihustamist või kandmist katsekeha pinnale pintsli abil. Katsekeha töötlemise meetod ja pealekandmise määr (nt l/m^2) peab vastama kõnealuse konservandiga pinna töötlemise eeskirjale.

31. Katses võib kasutada ka tööstuslikult töödeldud puitu. Kõik toimingud tuleb registreerida protokollis ning konservandi peetumine sellel viisil töödeldud puidul tuleb välja selgitada ja kanda protokolli.

Katsekehade konditsioneerimine pärast töötlemist

32. Pärast töötlemist tuleb töödeldud katsekehad konditsioneerida vastavalt konservandi tarnija soovitustele, mis on esitatud uuritava konservandi märgisel, vastavalt tööstusliku töötlemise tavadele või vastavalt standardile EN 252.

▼M6

Katsekehade ettevalmistamine ja valimine

33. Pärast konditsioneerimist arvutatakse katsekehade rühma kohta keskmine konservandi peetumine ning valitakse leostumiskatseks juhuslikkuse alusel kolm esindavat katsekehakomplekti, milles peetumise väärtused erinevad rühma keskväärtusest kuni 5 %.

KONSERVANDI HEITE MÕÕTMISE KÄIK

Sukeldamismeetod

34. Katsekehad kaalutakse ja sukeldatakse seejärel täielikult vette; märgitakse üles selle kuupäev ja kellaaeg. Nõu kaetakse, et vähendada aurumist.

35. Vett vahetatakse järgmistel aegadel: 6 tundi, 1 päev, 2 päeva, 4 päeva, 8 päeva, 15 päeva, 22 päeva, 29 päeva pärast katse algust. Märgitakse üles iga veevahetuse kuupäev ja kellaaeg ning nõust saadud vee mass.

36. Pärast iga veevahetust võetakse veest, millesse katsekehade komplekt on olnud sukeldatud, proov hilisema keemilise analüüsi jaoks.

37. Proovide võtmise kord võimaldab arvutada heite koguse sõltuvuse ajast. Proove tuleks hoida tingimustes, milles uuritav aine hästi säilib, näiteks külmkapis pimeduses, et vähendada proovis mikroobide kasvu enne analüüsi.

HEITE MÕÕTMISED

Töödeldud proovid

38. Võetud veeproove analüüsitakse keemiliselt toimeaine ja/või selle lagunemis- või muundumissaaduste määramiseks, kui see on asjakohane.

Töötlemata katsekehad

39. Vee (heitekeskkonna) kogumine selles süsteemis ja töötlemata puiduproovidest leostunud kemikaalide hilisem määramine võimaldab hinnata konservandi võimaliku heite kiirust töötlemata puidust. Heitekeskkonna proovide kogumine pärast üha pikenevat kokkupuuteaega ja analüüsimine võimaldavad hinnata heitekiiruse sõltuvust ajast. Kõnealuse analüüsi tegemine on kontrollmeetod töötlemata puidus oleva uuritava kemikaali tausttaseme määramiseks; sellega tõendatakse, et katsekehade allikana kasutatud puitu ei ole varem konservandiga töödeldud.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Keemilised analüüsid

40. Kogutud veeproove analüüsitakse keemiliselt ja veeanalüüsi tulemused väljendatakse asjakohastes ühikutes, näiteks µg/l.

Andmete esitamine

41. Kõik tulemused registreeritakse. Liites on esitatud soovitatud registreerimisvormi näide ühe töödeldud katsekehade komplekti jaoks ja kokkuvõtlik tabel heite keskväärtuste arvutamiseks iga proovivõtuajavahemiku puhul.

42. Päevane heitevoog mg/m^2/päev arvutatakse nii, et kolme paralleelkatse kolmest mõõtmisest võetakse keskväärtus ja jagatakse sukelduspäevade arvuga.

▼**M6**

Katseprotokoll

43. Katseprotokollis esitatakse vähemalt järgmine teave:

— uuritava puidukonservandi tarnija nimi;

— uuritava puidukonservandi konkreetne ja spetsiifiline nimi või kood;

— konservandi toimeaine(te) kaubanduslik või tavanimetus koos komponentide üldise kirjeldusega (nt kaaslahusti, vaik) ja koostisega massiprotsentides;

— asjakohane peetunud kogus või pealekandmise määr (vastavalt kg/m^3 või l/m^2) puidu kohta, mis on viidud kokkupuutesse veega;

— kasutatud puiduliik, tihedus ja aastaringide arv 10 mm kohta;

— uuritava puidukonservandi peetunud kogus või pealekandmise määr (l/m^2 või kg/m^3) ja selle arvutamiseks kasutatud valem;

— konservandiga töötlemise meetod, milles on täpselt kirjeldatud puidu immutamise režiimi või pealekandmise meetodit, kui seda kasutati;

— konservandiga töötlemise kuupäev ja puitkatsekehade hinnanguline niiskusesisaldus protsentides;

— kasutatud konditsioneerimismeetod, täpsustades selle tüübi, tingimused ja kestuse;

— puitkatsekeha otste sulgemise vahendi kirjeldus ja pealekandmiskordade arv;

— iga järgnenud töötlemise kirjeldus, nt pealekantud värvi tarnija, värvi tüüp, omadused ja pealekandmise määr;

— iga sukeldamise kohta alguse kuupäev ja kellaaeg, vee kogus, mida kasutati puitkatsekehade igal sukeldamisel, ja puidu poolt sukeldatud olekus sisseimatud vee kogus;

— kõik kõrvalekalded kirjeldatud meetodist ja kõik asjaolud, mis võivad olla mõjutanud tulemusi.

KIRJANDUS

(1) European Standard, EN 84 – 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

(2) European Standard, EN 113/A1 – 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

(3) European Standard, EN 252 – 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

(4) European Standard, EN 335 – Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products – Definition of use classes – Part1: General.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼**M6**

1. liide

Katsemeetodi tulemuste registreerimise vorm

Puidukonservandiga töödeldud puidust keskkonda toimuva heite hindamine. Laboratoorne meetod heite määramiseks katmata puidust, mis on kokkupuutes magevee või mereveega

Katse läbiviinud asutus	

Puidukonservant

Konservandi tarnija	
Puidukonservandi konkreetne ja spetsiifiline nimi või kood	
Konservandi kaubanduslik või tavanimi	
Muud koostisained	
Asjakohane peetunud konservandi kogus veega kokkupuutesse viidud puidu kohta	

Töötlemine

Pealekandmisviis	
Pealekandmise kuupäev	
Peetunud koguse arvutamiseks kasutatud valem:	
Konditsioneerimisviis	
Konditsioneerimise kestus	
Otste sulgemiseks kasutatud vahend ja pealekandmiskordade arv	
Edasine töötlemine	kui see on asjakohane

Katsekehad

Puiduliik	
Puidu tihedus	(miinimum … keskväärtus … maksimum)
Kasvu kiirus (aastaringide arv 10 mm kohta)	(miinimum … keskväärtus … maksimum)
Niiskusesisaldus	

▼M6

Katsekehakomplektid (*)	**Peetunud kogus (nt kg/m^3)**
Töödeldud „x”	5 katsekeha keskväärtus ja standardhälve või vahemik
Töödeldud „y”	5 katsekeha keskväärtus ja standardhälve või vahemik
Töödeldud „z”	5 katsekeha keskväärtus ja standardhälve või vahemik
Töötlemata	
Kõrvalekaldumised katsemeetodi näitajatest	nt vee kvaliteet, katsekehade mõõtmed jne

(*) x, y, z tähistavad kolme paralleelset proovi

▼M6

Aeg	Veevahetus	Katsekeha mass		Vee sidumine		Veeproov				
		Töödeldud (keskmine)	Töötlemata	Töödeldud (keskmine)	Töötlemata		Katses kasutatav vesi	x	y	z
	Kuupäev	g	g	g	g	Nr	pH	pH	pH	pH
algus										
6 tundi						1				
24 tundi						2				
2 päeva						3				
4 päeva						4				
8 päeva						5				
15 päeva						6				
22 päeva						7				
29 päeva						8				

▼M6

Palun koostage eraldi tabelid iga toimeaine kohta

Aeg	Veevahetus	Analüüsitulemused:															
		Töötlemata katsekehad			Töödeldud katsekehad												
					Toimeaine kontsentratsioon vees				Heite kogus				Leostumise kiirus				
		Toimeaine kontsentratsioon vees mg/l	Heite kogus mg/m^2	Leostumise kiirus mg/m^2/päev	x	y	z	Keskmine	x	y	z	Keskmine	x	y	z	Keskmine
	Kuupäev				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2/päev	mg/m^2/päev	mg/m^2/päev	mg/m^2/päev
6 tundi																
24 tundi																
2 päeva																
4 päeva																
8 päeva																
15 päeva																
22 päeva																
29 päeva																

Märkus: Kuna töötlemata katsekehade tulemusi võib olla vaja kasutada töödeldud katsekehade tulemuste parandamiseks, tuleks töötlemata katsekehade tulemused esitada esimesena ja kõik töödeldud katsekehadega saadud tulemused peaksid olema parandatud väärtused. Samuti võib olla vajalik kasutada esialgse vee analüüsist saadud parandit.

▼**M6**

2. liide

Mõisted

Keemiline aine: aine või segu

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M6

C.46. BIOAKUMULATSIOON PÕHJASETETES ELAVATES VÄHEHARJASUSSIDES

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga 315 (2008), milles käsitletakse põhjasetetes elavaid ja nendest toituvaid loomi, kes võivad kokku puutuda setetesse kogunevate ainetega (1). Selliste põhjasetetest toituvate loomade hulgas on oluline osa veekeskkonna väheharjasussidel, kes asuvad veekeskkonna süsteemide alumises otsas. Nad elavad setetes ja on sageli kõige levinum liik elupaikades, mille tingimused ei sobi muudele loomadele. Tänu setete bioturbatsioonile ja muude loomade söödaga varustamisele võib nendel loomadel olla suur mõju selliste ainete biokättesaadavuse tagamisel muude organismide, näiteks põhjaloomadest toituvate kalade jaoks. Vastupidiselt põhjasetete pinnal elavatele organismidele kaevuvad põhjasetetes elavad veekeskkonna väheharjasussid setetesse ja toituvad setteosakestest, mis on setete pinnast allpool. Seepärast puutuvad need organismid saasteainetega kokku mitmel viisil – otsese kontakti, saastunud setteosakeste, poorides oleva vee ja setet katva vee allaneelamise kaudu. Mõnd põhjasetetes elavate väheharjasusside liiki, keda praegu ökotoksikoloogilistes katsetes kasutatakse, on kirjeldatud 6. liites.

2. Uuritava aine bioakumulatsiooni iseloomustavate näitajate hulka kuuluvad kõigepealt bioakumulatsioonitegur (*bioaccumulation factor*, BAF), settest omastamise kiiruskonstant (k_s) ja eraldumise kiiruskonstant (k_e). Nende näitajate üksikasjalikud määratlused on esitatud 1. liites.

3. Ainete bioakumulatsioonivõime üldiseks hindamiseks ja setete pinnale või sisse kogunema kalduvate ainete bioakumulatsiooni uurimiseks oleks vaja seda keskkonnaosa iseloomustavat katsemeetodit (1, 2, 3, 4).

4. Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata end setetega siduvate ainete bioakumulatsiooni põhjasetetes elavatesse väheharjasussidesse. Setet rikastatakse uuritava ainega. Rikastatud sette kasutamisega soovitakse modelleerida saastunud setet.

5. Käesolev meetod põhineb olemasolevatel sette mürgisuse ja bioakumulatsiooni katsemeetoditel (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Muud kasulikud dokumendid on järgmised: rahvusvahelise seminari arutelu ja tulemused (11) ning rahvusvaheliste võrdluskatsete tulemused (12).

6. Selle katsega uuritakse stabiilseid neutraalseid orgaanilisi aineid, mis seovad end setetega. Käesoleva meetodiga saab uurida ka end setetega siduvate stabiilsete metallorgaaniliste ühendite bioakumulatsiooni (12). Meetodit ei saa kasutada metallide ja muude mikroelementide puhul (11), kui ei muudeta katseplaani – substraadi ja vee ruumalasid ning arvatavasti ka koeproovi suurust.

EELTINGIMUS JA TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

7. Praeguseks on bioakumulatsiooni kohta kindlaks tehtud ainult mõned selged kvantitatiivsed struktuuri-aktiivsuse sõltuvused (*Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR) (14). Kõige laialdasemalt kasutatav sõltuvus on stabiilsete orgaaniliste ainete bioakumulatsiooni ja biokontsentratsiooni ning nende lipofiilsuse vahel (mida väljendab oktanooli-vee jaotuskoefitsiendi logaritm (log K_{ow}); mõiste vt 1. liide), mis on välja arendatud aine vee ja

▼M6

kala vahel jaotumise kirjeldamiseks. Ka sette kohta on kindlaks tehtud selliseid sõltuvusi (15, 16, 17, 18). Peamise kvantitatiivse struktuuri-aktiivsuse sõltuvusena võib log K_{ow}-log BCFi sõltuvus (kus BCF on biokontsentratsiooni tegur) abiks olla end settega siduvate ainete bioakumulatsioonivõime esmasel hindamisel. Siiski võib bioakumulatsiooni tegurit mõjutada katseloomaks valitud organismide lipiidisisaldus ja sette orgaanilise süsiniku sisaldus. Seepärast võib ka orgaanilise süsiniku – vee jaotuskoefitsienti (K_{oc}) kasutada olulise tegurina end settega siduvate orgaaniliste ainete bioakumulatsioonivõime määramisel.

8. Käesolevat katset saab kasutada, kui tegemist on:

— stabiilse orgaanilise ainega, mille log K_{ow} väärtus on vahemikus 3,0–6,0 (5, 19), ja ka väga lipofiilse ainega, mille log K_{ow} on suurem kui 6,0 (5);

— selliste orgaaniliste ainete hulka kuuluva ühendiga, mille kalduvus elusorganismidesse kuhjuda on teada, nt pindaktiivsed ained või tugevasti adsorbeeruma kalduvad ained (nt kõrge K_{oc} väärtus).

9. Enne katse alustamist tuleks uuritava aine kohta koguda näiteks järgmine teave: ohutusabinõud, sobivad säilitamistingimused ja stabiilsus ning analüüsiks sobivad meetodid. Juhised selliste ainete uurimiseks, mille füüsikaliskeemilised omadused raskendavad katse tegemist, on esitatud publikatsioonides (20) ja (21). Enne, kui hakatakse uurima aine bioakumulatsiooni põhjasetetes elavatesse väheharjasussidesse, peaks uuritava aine kohta olemas olema järgmine teave:

— tavanimetus, keemiline nimetus (eelistatavalt Rahvusvahelise Puhta ja Rakenduskeemia Liidu (IUPAC) nimetus), struktuurivalem, CASi registreerimisnumber, puhtus;

— lahustuvus vees [katsemeetod A.6 (22)];

— oktanooli-vee jaotuskoefitsient K_{ow} [katsemeetodid A.8, A.24 (22)];

— sette-vee jaotuskoefitsient, mis on väljendatud K_d või K_{oc}-na [katsemeetod C.19 (22)];

— hüdrolüüs [katsemeetod C.7 (22);

— fotokeemiline muundumine vees (23);

— aururõhk [katsemeetod A.4 (22)];

— kiire biolagunduvus [katsemeetodid C.4 ja C.29 (22)];

— pindpinevus [katsemeetod A.5 (22)];

— kriitiline mitsellimoodustumise kontsentratsioon (24).

Lisaks on asjakohane veel järgmine teave, kui see on leitav:

— biolagunemine veekeskkonnas [katsemeetodid C.24 ja C.25 (22)];

— Henry konstant.

10. Radioaktiivse märgisega katseaine võib lihtsustada vee, sette ja bioloogiliste proovide analüüsi ning seda võib kasutada otsustamiseks, kas on vaja kindlaks teha ja mõõta ka lagunemissaadusi. Siinkirjeldatud meetod valideeriti rahvusvahelistes võrdluskatsetes (12), milles kasutati ^{14}C-märgisega aineid. Kui mõõdetakse radioaktiivsete jääkide kogusisaldust, põhineb bioakumulatsioonitegur (BAF) lähteainel, hõlmates sealhulgas ka kõiki peetunud lagunemissaadusi. Samuti on võimalik kombineerida metabolismi uuringut bioakumuleerumise uuringuga; selleks analüüsitakse ja määratakse lähteaine ning

▼M6

selle lagunemissaaduste protsent proovidest, mis on võetud omastamisfaasi lõpus või bioakumulatsiooni haripunktis. Igal juhul on soovitatav, et bioakumulatsiooniteguri arvutamine põhineks lähteaine sisaldusel organismides ja mitte ainult radioaktiivsete jääkide kogusisaldusel.

11. Lisaks uuritava aine omadustele on vaja teada veel tema mürgisust väheharjasussiliikidele, keda kasutatakse katses, näiteks mediaanset surmavat kontsentratsiooni (LC_{50}) selle ajavahemiku jaoks, mis on vajalik omastamisperioodiks, et osata valida mürgisest tasemest oluliselt madalam kokkupuutekontsentratsioon. Andmete olemasolu korral tuleks eelistada subletaalsete näitajate pikaajaliste uuringutega saadud subletaalseid näitajaid (EC_{50}). Kui sellised andmed ei ole kättesaadavad, võivad kasulikku teavet anda muude katseloomadega saadud mürgisusandmed või akuutse toksilisuse katse tingimustel, milles kavatsetakse uurida bioakumulatsiooni.

12. Kättesaadav peab olema asjakohane teadaoleva täpsuse ja tundlikkusega analüüsimeetod aine kvantitatiivse sisalduse mõõtmiseks katselahustes, settes ja bioloogilises materjalis, samuti andmed proovi valmistamise ja säilitamise kohta ning materjali ohutuskaardid. Samuti peaksid teada olema uuritava aine analüütilised tuvastuspiirid vees, settes ja usside kudedes. Kui kasutatakse radioaktiivse märgisega uuritavat ainet, peaks olema teada eriradioaktiivsus (s.o Bq mol^{-1}), märgisega aatomi täpne asukoht ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsent. Uuritava aine eriradioaktiivsus peaks olema võimalikult suur, et tuvastada võimalikult väikseid uuritava aine kontsentratsioone (11).

13. Kättesaadav peaks olema teave sette kohta, mida katses kasutatakse (nt sette või selle koostisosade päritolu, poorivee pH ja ammoniaagi kontsentratsioon (looduslikud setted), orgaanilise süsiniku sisaldus (TOC), osakeste suurusjaotus (liiva, tolmu ja savi % kuivainest) (6).

KATSE PÕHIMÕTE

14. Katse koosneb kahest faasist: omastamise (kokkupuute) faas ja (aine) eraldumise (kokkupuutejärgne) faas. Omastamisfaasi ajal puutuvad ussid kokku uuritava ainega rikastatud settega, mille kohal on taastatud vesi ja mis on vajaduse korral tasakaalustatud (11). Usside kontrollrühmi hoitakse katseloomade puhul kasutatavatega identsetes tingimustes, aga ilma uuritava aineta.

15. Eraldumisfaasi ajaks kantakse ussid üle sette ja vee süsteemi, milles ei ole uuritavat ainet. Eraldumisfaas on vajalik selleks, et saada teavet kiiruse kohta, millega uuritavat ainet katseorganismidest väljutatakse (19, 25). Eraldumisfaas on vajalik alati, välja arvatud juhul, kui kokkupuute ajal on uuritava aine omastamine tühiselt väike (näiteks kui uuritava aine kontsentratsioon katse- ja kontrollrühma ussides statistiliselt ei erine). Kui omastamisfaasi ajal statsionaarse olekuni ei jõuta, saab kineetilisi parameetreid (kineetiline bioakumulatsioonitegur BAF_k, omastamise ja eraldumise kiiruskonstant/-konstandid) määrata eraldumisfaasi tulemuste kasutamisega. Uuritava aine kontsentratsiooni muutumist ussides/usside peal jälgitakse katse mõlema faasi ajal.

16. Omastamisfaasi ajal tehakse mõõtmisi, kuni BAF on jõudnud platoole või statsionaarsesse olekusse. Vaikimisi peaks omastamisfaas kestma 28 päeva. Praktilised kogemused on näidanud, et 12–14-päevane omastamisfaas on paljude stabiilsete neutraalsete orgaaniliste ainete puhul piisav statsionaarse oleku saavutamiseks (6, 8, 9).

▼M6

17. Kui statsionaarse olekuni ei jõuta 28 päevaga, alustatakse eraldumisfaasi: uuritava ainega kokkupuutes olnud väheharjasussid kantakse üle sama keskkonnaga nõusse, mis aga ei sisalda uuritavat ainet. Eraldumisfaas lõpetatakse, kui uuritava kemikaali sisaldus ussides langeb 10 %-ni sellest, mis mõõdeti 28. päeval, või kui on möödunud kuni 10 päeva. Jääkide sisaldus ussides eraldumisfaasi lõpus (*Non-eliminated residues*, NER) on üks täiendavaid mõõdetavaid ja teatatavaid näitajaid. Bioakumulatsioonitegur (BAF_{ss}) arvutatakse eelistatult nii ussides leitud kontsentratsiooni (C_a) ja settes leitud kontsentratsiooni (C_s) suhtarvuna kui ka settest omastamise kiiruskonstandi (k_s) ja eraldumise kiiruskonstandi (k_e) suhtarvuna ehk kineetilise bioakumulatsioonitegurina (BAF_K), eeldades esimest järku kineetikat. Kui statsionaarse olekuni ei jõuta 28 päeva jooksul, arvutatakse BAF_K omastamise kiiruskonstandist ja eraldumise kiiruskonstandist. Arvutused vt 2. liide. Kui kineetika ei ole esimest järku, tuleks kasutada keerulisemaid mudeleid (2. liide ja viide 25).

18. Kui statsionaarse olekuni ei jõuta 28 päevaga, võib omastamisperioodi soovi korral pikendada ja jätkata kokkupuutes olevate ussirühmade mõõtmisi, kuni saavutatakse statsionaarne olek; paralleelselt sellega tuleks omastamisfaasi 28. päeval siiski alustada eraldumisfaasi.

19. Omastamise kiiruskonstant, eraldumise kiiruskonstant (või kiiruskonstandid, kui kasutatakse keerulisemaid mudeleid), kineetiline bioakumulatsioonitegur (BAF_K) ja võimaluse korral iga nimetatud parameetri usalduspiirid arvutatakse teoreetilise mudeli võrranditest (vt mudelid, 2. liide). Mudeli sobivust katseandmetega saab hinnata korrelatsioonikordaja või determinatsioonikordaja järgi (kui kordaja läheneb 1-le, kirjeldab mudel katseandmeid hästi).

20. Katsetulemuste varieeruvuse vähendamiseks väga lipofiilsete orgaaniliste ainete puhul tuleks bioakumulatsiooni tegurid täiendavalt esitada ka sõltuvusena katses kasutatavate organismide lipiidisisaldusest ja orgaanilise süsiniku üldsisaldusest (TOC) setetes (*biota-sediment accumulation factor*, BSAF), väljendatuna sette orgaanilise süsiniku kg usside lipiidisisalduse kg kohta. See lähenemisviis põhineb kogemustel ja veekeskkonna teoreetilistel korrelatsioonidel, kus teatavate keemiliste ainete klasside puhul on leitud selge seos aine bioakumuleerumisvõime ja lipofiilsuse vahel, mis on kindlaks tehtud kalade kui mudelorganismide abil (14, 25, 27). Kõnealuste ainete puhul jälgitav bioakumulatsioon sõltub ka katses kasutatud kalade lipiidisisaldusest. Põhjaorganismide puhul on leitud samalaadseid korrelatsioone (15, 16, 17, 18). Kui usside biomassi on piisavalt, saab katseloomade lipiidisisalduse määrata samast bioloogilisest materjalist, millest määrati uuritava aine kontsentratsioon. Siiski on lipiidisisalduse mõõtmiseks otstarbekas kasutada kohanenud kontroll-loomi vähemalt omastamisfaasi alguses või eelistatavalt lõpus, lipiidisisaldust saab seejärel kasutada bioakumulatsiooniteguri (BAF) normeerimiseks.

KATSE NÕUETEKOHASUS

21. Katse on nõuetekohane järgmistel tingimustel:

— usside kumulatiivne suremus (kontrollrühmas ja kokkupuuterühmas) kuni katse lõpuni ei tohiks ületada 20 % nende esialgsest arvust.

— lisaks sellele tuleb tõendada, et ussid kaevuvad settesse, nii et kokkupuude oleks maksimaalne. Täpsemalt vt punkt 28.

▼M6

MEETODI KIRJELDUS

Katses kasutatavad liigid

22. Katse tegemiseks võib kasutada mitut veekeskkonna väheharjasusside liiki. Kõige sagedamini kasutatavad liigid on loetletud 6. liites.

23. Mürgisuskatseid (96 tundi, üksnes vees) tuleks teha korrapäraste ajavahemike järel (nt kord kuus) võrdlusainega nagu kaaliumkloriid (KCl) või vasksulfaat ($CuSO_4$) (1) selleks, et saada teavet katseloomade terviseseisundi kohta (1, 6). Kui kontroll-mürgisuskatset korrapäraste ajavahemike järel ei tehta, tuleks sette bioakumulatsiooni katses kasutatavate loomade partiid kontrollida võrdlusaine abil. Lipiidisisalduse määramine võib samuti anda kasulikku teavet loomade seisundi kohta.

Katses kasutatavate loomade kasvatamine

24. Bioakumulatsiooni katsete tegemiseks piisava arvu usside saamiseks võib usse pidada labori alalises ühe-liigi-kultuuris. Valitud katseloomaliikide laboris kasvatamise meetodid on esitatud 6. liites. Üksikasjade kohta vt viited (8, 9, 10, 18, 28, 29, 30, 31, 32).

Seadmed

25. Tuleks olla tähelepanelik, et vältida seadmete kõigis osades selliste materjalide kasutamist, mis võivad lahustuda, uuritavat ainet adsorbeerida või muid kemikaale eraldada ning avaldada katseloomadele kahjulikku mõju. Võib kasutada tavapäraseid ristkülikukujulisi või silindrilisi kambreid, mis on valmistatud keemiliselt inertsest materjalist ja on sobiva mahuga katseusside paigutamiseks vastavalt lubatud koormuse määrale. Tuleks vältida pehmest plastikust torude kasutamist vee ja õhu lisamiseks. Katse kasvukeskkonnaga kokkupuutuvates seadmetes tuleks kasutada polütetrafluoroetüleeni, roostevaba terast ja/või klaasi. Suure adsorptsioonikoefitsiendiga ainete korral (näiteks sünteetilised püretroidid) võib olla vaja kasutada silaanitud klaasi. Sellistel juhtudel tuleb seadmed pärast kasutamist ära visata (5). Radioaktiivse märgisega uuritava aine ja lenduva aine puhul tuleks olla hoolikas, et vältida uuritava aine väljapuhumist ja väljapuhutud uuritava aine kaotsiminekut. Tuleb kasutada püüdureid (nt sobiva absorbendiga klaasist gaasipesupudelit), mis peab kinni katsekambritest aurustunud jäägid (11).

Vesi

26. Kattev vesi peab olema sellise kvaliteediga, mis tagab valitud katseloomaliigi ellujäämise aklimatsiooni- ja katseperioodide vältel, ilma et tekiks mingeid ebanormaalse välimuse või käitumise ilminguid. Katva veena katsete ajal ja ka usside laborikultuuris pidamisel soovitatakse kasutada taastatud vett vastavalt katsemeetodile C.1 (25). On näidatud, et sellises vees saavad mitmed katseliigid ellu jääda, kasvada ja paljuneda (8) ning seejuures on tagatud katse- ja kasvatustingimuste maksimaalne standardsus. Kasutatud vee kohta tuleks teatada vähemalt pH, elektrijuhtivus ja karedus. Kasulikku teavet peaks andma vee mikrosaasteainete määramine enne kasutamist (4. liide).

27. Katseperioodi kestel peaks vesi olema konstantse kvaliteediga. Katva veekihi pH peaks olema vahemikus 6–9. Vee üldkaredus peaks katse alguses olema vahemikus 90–400 mg $CaCO_3$ liitris (7). Kõnealuse taastatud vee pH ja

▼M6

kareduse vahemikud on esitatud katsemeetodis C.1 (25). Kui võib kahtlustada mingit vastastikust mõju karedust tekitavate ioonide ja uuritava aine vahel, tuleks kasutada väiksema karedusega vett. 4. liites on esitatud täiendavad kriteeriumid lahjendusvee vastuvõetavaks tunnistamiseks vastavalt OECD katsejuhendile 210 (34).

Sete

28. Katses kasutatav sete peab olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab katseorganismidel selles elada ja eelistatavalt paljuneda aklimatiseerumise ja katse ajavahemike vältel, ilma et neil tekiks ebatavalisi muutusi välimuses või ebatavalist käitumist. Ussid peaksid saama settesse kaevuda. Katseorganismide kaevumiskäitumine võib mõjutada kokkupuudet uuritava ainega ja seega BAFi väärtust. Seega tuleks jälgida sette vältimist katseloomade poolt ja nende kaevumiskäitumist, kui katva veekihi hägusus võimaldab vaatlusi, ning kanda vaatluste tulemused protokolli. Kontroll- ja kokkupuuterühmade ussid peaksid kaevuma settesse 24 tunni jooksul pärast nende lisamist katsenõudesse. Kui märgatakse, et ussid püsivalt settesse ei kaevu või väldivad setet (näiteks on selliseid usse üle 20 %, kui möödunud on üle poole omastamisfaasist), siis näitab see, et kas ei ole katsetingimused sobivad või ei ole katseloomad terved või põhjustab sellist käitumist uuritav aine. Sellisel juhul tuleks katse peatada ja seda tuleks korrata paremates tingimustes. Täiendavat teavet sette allaneelamise kohta saab publikatsioonides (35, 36) kirjeldatud meetoditest, milles täpsustatakse sette allaneelamist või osakeste valimist katseorganismide poolt. Kui seda on võimalik vaadelda, siis vähemalt sette allaneelamisele osutavate fekaaliterade olemasolu või puudumine sette pinnal tuleks registreerida ja seda tuleb arvesse võtta katse tulemuste tõlgendamisel, kuna see annab teavet usside ja uuritava aine kokkupuuteteede kohta.

29. Katsetes ja usside laborikultuurides (5. liide) soovitatakse kasutada tehissetet, mis põhineb katsemeetodis C.8 (40) kirjeldatud tehismullal, kuna vajaliku kvaliteediga looduslik sete ei pruugi kogu aasta jooksul olla kättesaadav. Lisaks võib looduslikus settes olla oma fauna ja ka mikrosaasteained, mis võivad mõjutada katse tulemusi. Mitmed katseliigid jäävad tehissettes ellu, kasvavad ja paljunevad (8).

30. Tehissette kohta esitatakse vähemalt järgmine teave: koostisosade päritolu, osakeste suurusjaotus (liiva, tolmu ja savi protsent), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC), veesisaldus ja pH. Redokspotentsiaal mõõdetakse vajaduse korral. Ent ka reostamata kohast pärit looduslikku setet võib kasutada nii katse tegemisel kui ka katseloomade kasvatamisel (1). Loodusliku sette kirjeldamisel tuleks esitada vähemalt järgmised andmed: päritolu (võtmise koht), pH, poorivee ammoniaagisisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC), osakeste suurusjaotus (liiva, tolmu ja savi protsent) ja veesisalduse protsent (6). Enne loodusliku sette rikastamist uuritava ainega on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus, kui eeldatakse ammoniaagi tekkimist. Selle konditsioneerimisperioodi lõpus tuleks kattev veekiht eemaldada ja ära visata. Sette või selle koostisosade mikrosaasteainete analüüsi tegemine enne kasutamist peaks andma kasulikku teavet.

Valmistamine

31. Loodusliku sette käitlemist enne laboris kasutamist on kirjeldatud publikatsioonides (1, 6, 44). Tehissette valmistamist on kirjeldatud 5. liites.

▼M6

Säilitamine

32. Loodusliku sette säilitamisaeg laboris peaks olema võimalikult lühike. Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseagentuur soovitab (6) seda säilitada kuni 8 nädalat 4 ± 2 °C juures pimedas. Säilitamisnõus ei tohiks sette kohal olla vabaruumi. Soovitused tehissette säilitamiseks on esitatud 5. liites.

Uuritava aine lisamine

33. Sete rikastatakse uuritava ainega. Rikastamisel kaetakse üks või mitu sette koostisosa uuritava ainega. Näiteks kvartsliiva või osa sellest (nt 10 g kvartsliiva katsenõu kohta) võib immutada sobivas lahustis lahustatud uuritava ainega; seejärel aurustatakse lahusti aeglaselt kuni kuivamiseni. Ainega kaetud komponendi saab seejärel segada niiske sette sisse. Sette valmistamisel tuleb arvesse võtta uuritava aine ja liiva segust pärit liiva, s.o sete tuleks siis valmistada väiksema liivakogusega (6).

34. Kui kasutatakse looduslikku setet, võib uuritavat ainet lisada sette õhu käes kuivatatud osa rikastamise teel, nagu on kirjeldatud eespool tehissette puhul, või uuritava aine ja niiske sette segamisega, kasutades seejärel aurustamise etappi (kui kasutatakse lahustit). Sobivad lahustid märja sette rikastamisel on etanool, metanool, etüleenglükoolmonometüüleeter, etüleenglükooldimetüüleeter, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool (5, 34). Sobiva lahusti valimisel peaksid peamised kriteeriumid olema lahusti mürgisus ja lenduvus ning uuritava aine lahustuvus valitud lahustis. Täiendavad juhised rikastamismeetodite kohta on esitatud publikatsioonis Environment Canada (1995) (41). Tuleks hoolitseda, et settele lisatud uuritav aine oleks settes põhjalikult ja ühtlaselt jaotatud. Rikastatud settest tuleks võtta mitu osaproovi ja teha nende analüüsid, et kontrollida uuritava aine kontsentratsiooni settes ja teha kindlaks, kuivõrd ühtlane on uuritava aine jaotus.

35. Kui rikastatud sete koos katva veekihiga on valmistatud, on soovitatav lasta uuritaval ainel jaotuda settefaasi ja veefaasi vahel. Seda tuleks eelistatavalt teha katses kasutatavates temperatuuri- ja õhustustingimustes. Vajalik tasakaalustumisaeg sõltub settest ja ainest ning võib kesta tunde, päevi ja harvadel juhtudel isegi kuni mitu nädalat (4–5 nädalat) (28, 42). Käesolevas katses tasakaalu saabumist ei oodata, kuid soovitatav on jätta tasakaalustumiseks 48 tundi kuni 7 päeva. Olenevalt uuringu eesmärgist võib näiteks keskkonnatingimuste modelleerimisel rikastatud setet tasakaalustada või vanandada pikema aja jooksul (11).

KATSE KÄIK

Eelkatse

36. Eelkatse on vajalik selleks, et optimeerida lõpliku katse tingimusi nagu uuritava aine kontsentratsioon(id), omastamis- ja eraldumisfaasi kestus. Eelkatse käigus tuleb jälgida usside käitumist, näiteks sette vältimist (st ussid põgenevad settest, mille põhjuseks võib olla uuritav aine ja/või sete

▼M6

ise), ja kõik tähelepanekud tuleks registreerida. Sette vältimist võib kasutada ka subletaalse näitajana eelkatses, mis võimaldab hinnata uuritava aine kontsentratsiooni või kontsentratsioonivahemikku, mida tuleb kasutada bioakumulatsiooni katses.

Kokkupuutetingimused

Omastamisfaasi kestus

37. Katseorganismid puutuvad uuritava ainega kokku omastamisfaasi ajal. Esimene proov tuleks võtta vahemikus 4–24 tundi pärast omastamisfaasi algust. Omastamisfaasis tuleks katset jätkata, kuni on möödunud 28 päeva (1, 6, 11) või kuni saab tõendada, et juba varem on püstitunud tasakaal. Statsionaarne olek on saabunud siis, kui: i) kõigil proovivõtuaegadel on bioakumulatsiooniteguri ajast sõltuvuse graafik paralleelne ajateljega; ii) vähemalt kahepäevase vahega võetud proovidest määratud kolm järjestikust BAF väärtust erinevad üksteisest vähem kui ± 20 %; ning iii) statistiline analüüs (nt dispersioonanalüüs ja regressioonianalüüs) näitab, et kolme proovivõtuajavahemiku proovide analüüsivastustes ei ole olulisi erinevusi. Kui 28 päevaga statsionaarse olekuni ei jõuta, võib omastamisperioodi lõpetada ja alustada eraldumisfaasi; BAF_K saab arvutada omastamise ja eraldumise kiiruskonstantidest (vt ka punktid 16–18).

Eraldumisfaasi kestus

38. Esimene proov tuleks võtta 4–24 tundi pärast eraldumisfaasi algust, kuna alguses võib jääkide sisaldus kudedes kiiresti muutuda. Eraldumisfaas on soovitatav lõpetada, kui uuritava aine kontsentratsioon on alla 10 % statsionaarse oleku kontsentratsioonist või pärast kuni 10 päeva. Jääkide sisaldus ussides eraldumisfaasi lõpus kantakse protokolli kui eraldumatud jäägid; see on teisene otsitav näitaja. Eraldumisfaasi pikkus võib olla piiratud ajavahemikuga, mille kestel uuritava aine kontsentratsioon ussides jääb veel ülespoole analüütilisest määramispiirist.

Katseloomad

Katses kasutatavate usside arv

39. Usside arv proovi kohta peab olema piisavalt suur, et tagada sellise usside koemassi olemasolu, milles uuritava aine mass omastamisfaasi alguses ja eraldumisfaasi lõpus oleks oluliselt suurem uuritava aine avastamispiirist bioloogilistes materjalides. Omastamisfaasi ja eraldumisfaasi nimetatud etappides on uuritava aine kontsentratsioon tavaliselt suhteliselt väike (6, 8, 18). Kuna paljude veekeskkonna väheharjasussiliikide üksikisendi mass on väga väike (märgmass on *Lumbriculus variegatus*'e ja *Tubifex tubifex*'i puhul 5–10 mg), võib konkreetse katsekambri ussid koondada üheks prooviks kaalumise ja uuritava aine määramise jaoks. Suurema üksikisendi massiga katseliikide (nt *Branchiura sowerbyi*) puhul võib kasutada ühest isendist koosnevaid paralleelkatseid, kuid sellisel tuleks paralleelkatsete arv suurendada viieni iga proovivõtukorra kohta (11). Tuleb siiski märkida, et *B. sowerbyi*'d ei olnud laboritevahelise võrdlusuuringu (12) liikide hulgas, ja seepärast ei saa seda soovitada meetodi puhul eelistatava liigina.

40. Tuleks kasutada ühesuguse suurusega usse (*L. variegatus*'e kohta vt 6. liide). Ussid peaksid olema pärit ühest allikast ja tegemist peaks olema ühe vanuseklassi täiskasvanud või suurte loomadega (vt 6. liide). Looma mass ja vanus võivad oluliselt mõjutada BAFi väärtust (näiteks erineva lipiidisisalduse ja/või munade olemasolu tõttu); need näitajad tuleks korralikult registreerida. Usside keskmise märg- ja kuivmassi mõõtmiseks tuleks enne katse algust kaaluda usside osaproov.

▼M6

41. *Tubifex tubifex*'i ja *Lumbriculus variegatus*'e puhul tuleb eeldada paljunemist katse ajal. Kui bioakumulatsiooni katse ajal paljunemist ei toimu, tuleks see registreerida ja seda tuleks arvestada katse tulemuste tõlgendamisel.

Usside panemine katsesse

42. Tuleks kasutada suurt sette/usside ja vee/usside suhtarvu, et viia uuritava aine kontsentratsiooni vähenemine omastamisfaasi ajal miinimumini ja vältida lahustunud hapniku kontsentratsiooni vähenemist. Valitud koormusnorm peaks vastama ka valitud liigi looduslikule asustustihedusele (43). Näiteks *Tubifex tubifex*'i puhul soovitatakse koormusnormi 1–4 mg usside kudet (märgmass) 1 grammi märja sette kohta (8, 11). Viidetes (1) ja (6) soovitatakse *L. variegatus*'e puhul koormusnormi ≤ g usside koe kuivmassi sette 50 g orgaanilise süsiniku kohta.

43. Katses kasutatavad ussid eemaldatakse nende kasvunõust selles oleva sette sõelumisega. Loomad (täiskasvanud suured isendid, kellel ei ole hiljutise jagunemise märke) viiakse üle klaasnõudesse (nt Petri tassid), milles on puhas vesi. Kui katsetingimused erinevad kultuuri kasvutingimustest, peaks ussidele piisama 24 tunni pikkusest aklimatiseerumisfaasist. Enne kaalumist tuleks liigne vesi usside küljest kõrvaldada. Selleks pannakse ussid ettevaatlikult eelnevalt niisutatud pehmele paberile. Usse ei soovitata kuivatada kuivatuspaberiga, kuna see võiks tekitada neil stressi või vigastusi. Brunson *et al*. (1998) soovitavad kasutada kuivaks tupsutamata usse, kelle mass on umbes 1,33 korda suurem kui vajalik biomass. Need täiendavad 33 % on erinevus kuivaks tupsutatud ja tupsutamata usside massi vahel (28).

44. Omastamisfaasi alguses (katse 0-päev) võetakse ussid aklimatisatsioonikambrist ja jaotatakse juhuslikkuse alusel nõudesse (nt Petri tassidele), milles on taastatud vesi; usse lisatakse tassidele kahekaupa, kuni igal tassil on kümme ussi. Iga kõnealuse rühma ussid viiakse juhuslikkuse alusel üle eraldi katsenõudesse, nt pehmete teraspintsettide abil. Katsenõusid inkubeeritakse seejärel katse tingimustes.

Söötmine

45. Arvestades tehissette vähest toitainesisaldust tuleks settele lisada söödaallikas. Selleks et katseorganismide kokkupuudet mitte alahinnata, näiteks neile saastamata sööda valikulise manustamise tõttu, tuleb katseloomade paljunemiseks ja kasvuks vajalik sööt lisada settesse üks kord enne uuritava kemikaali lisamist või selle lisamise ajal (vt 5. liide).

Sette/vee suhtarv

46. Soovitatav sette/vee suhtarv on 1:4 (45). Sellist suhtarvu peetakse sobivaks, et hoida hapniku kontsentratsioon vajalikul tasemel ja vältida ammoniaagi teket katvas veekihis. Hapnikusisaldus katvas veekihis peaks pidevalt olema ≥ 40 % küllastuskontsentratsioonist. Katvat veekihti tuleks ettevaatlikult aereerida (nt 2–4 mulli sekundis) Pasteuri pipetiga, mis on paigutatud ligikaudu 2 cm kõrgusele sette pinnast, et setet võimalikult vähe häirida.

▼M6

Valgus ja temperatuur

47. Nii kasvatamisel kui ka katses on valgustusperiood 16 tundi (1, 6). Valguse intensiivsus katse piirkonnas peaks olema umbes 500–1 000 luksi. Temperatuur peaks olema kogu katse vältel 20 ± 2 °C.

Uuritava kemikaali kontsentratsioonid

48. Omastamise kineetika mõõtmiseks kasutatakse üht võimalikult väikest kontsentratsiooni, kuid võib kasutada veel ka teist, kõrgemat kontsentratsiooni (vt näiteks (46)). Sel juhul võetakse proovid pärast 28 päeva või statsionaarse oleku saabumist ja analüüsitakse neid, et kinnitada madalama kontsentratsiooni juures mõõdetud bioakumulatsioonitegurit (11). Suurem kontsentratsioon peaks olema valitud nii, et saab välistada kahjuliku toime (nt ligikaudu 1 % madalaimast teadaolevast kroonilise mürgisuse kontsentratsioonist EC_x, mis on saadud asjakohasest kroonilise mürgisuse katsest). Madalam uuritav kontsentratsioon peaks olema oluliselt suurem kui kasutatava analüüsimeetodi avastamispiir settes ja bioloogilistes proovides. Kui uuritava kemikaali toimet avaldav kontsentratsioon on analüütilise tuvastuspiiri lähedal, on soovitatav kasutada radioaktiivse märgisega uuritavat kemikaali, millel on suur eriradioaktiivsus.

Ainega kokkupuute katsete ja kontrollkatsete paralleelkatsed

49. Kineetika mõõtmiseks tuleb nii omastamis- kui ka eraldumisfaasi jooksul teha vähemalt kolm paralleelset ainega kokkupuute katset iga proovivõtupunkti kohta (11). Kui tahetakse võtta täiendavaid proove katse ajal, tuleks teha ka täiendavaid paralleelkatseid. Eraldumisfaasi jaoks valmistatakse ette sobiv arv paralleelkatseid rikastamata settega ja katva veega, nii et ainega kokkupuutunud ussid saab omastamisperioodi lõpus viia ettenähtud kontsentratsiooniga nõudest rikastamata nõudesse. Ainega kokkupuutumise paralleelkatsete arv peaks olema piisav nii omastamisfaasi kui ka eraldumisfaasi jaoks.

50. Teise võimalusena võib eraldumisfaasi ajal proovide võtmiseks ettenähtud ussid panna ühte suurde nõusse, milles on sama partii rikastatud sete kui see, mida kasutatakse omastamise kineetika määramiseks. Tuleks näidata, et katse tingimused (näiteks sette sügavus, sette ja vee suhtarv, koormus, temperatuur ja vee kvaliteet) on võrreldavad omastamisfaasi puhul kasutatavate paralleelkatsete tingimustega. Omastamisfaasi lõpus tuleks sellest nõust võtta vee, setete ja usside proovid analüüsi tegemiseks ning piisav arv suuri usse, kellel ei ole hiljutise jagunemise märke, tuleks hoolikalt välja võtta ja kanda üle eraldumisfaasi jaoks ettevalmistatud paralleelkatsetesse (nt kümme katselooma igasse paralleelkatsenõusse).

51. Kui peale vee ei kasutata muud lahustit, tuleks bioloogiliste ja taustanalüüside jaoks ette näha vähemalt 9 negatiivse kontrolli paralleelkatset (vähemalt 3 võetakse proovideks alguses, 3 omastamisfaasi lõpus ja 3 eraldumisfaasi lõpus). Kui uuritava kemikaali lisamiseks kasutatakse solubiliseerivat vahendit, tuleks lisaks uuritava ainega tehtavatele paralleelkatsetele teha ka lahusti kontrollrühma paralleelkatse (vähemalt 3 võetakse proovideks alguses, 3 omastamisfaasi lõpus ja 3 eraldumisfaasi lõpus). Sel juhul tuleks ette näha negatiivne (ilma lahustita) kontrollrühm nelja täiendava paralleelkatsega proovide võtmiseks omastamisfaasi lõpus. Neid paralleelkatseid võib võrrelda bioloogiliselt lahusti kontrollrühmaga, et saada teavet lahusti võimaliku mõju kohta katseorganismile. Üksikasjad on esitatud 3. liites.

▼M6

Vee kvaliteedi mõõtmise sagedus

52. Katvas veekihis tuleks omastamisfaasi ja eraldumisfaasi ajal määrata vähemalt järgmised vee kvaliteedi näitajad:

temperatuur	ühes nõus iga kontsentratsioonitaseme ja iga proovivõtukuupäeva kohta ja ühes kontrollnõus üks kord nädalas ning omastamisfaasi ja eraldumisfaasi alguses ja lõpus; ümbritseva keskkonna (katseruumi või vesivanni) temperatuuri või temperatuuri ühes esindavas katsenõus võib registreerida ka pidevalt või iga tunni tagant;
lahustunud hapniku sisaldus	ühes nõus iga kontsentratsioonitaseme kohta ja ühes kontrollnõus iga proovivõtukuupäeva kohta; väljendatakse ühikutes mg/l ja protsendina õhuga küllastumisel saadud väärtusest (*air saturation value*, ASV);
õhu juurdevool	kontrollitakse vähemalt üks kord (töö-)päeva jooksul ja reguleeritakse vajaduse korral;
pH	ühes nõus iga kontsentratsioonitaseme ja iga proovivõtukuupäeva kohta ja ühes kontrollnõus üks kord nädalas ning omastamisfaasi ja eraldumisfaasi alguses ja lõpus;
vee üldkaredus	vähemalt ühes uuritava ainega nõus ja ühes kontrollnõus omastamisfaasi ja eraldumisfaasi alguses ja lõpus, väljendatakse $CaCO_3$ milligrammidena liitris;
ammoniaagi üldsisaldus	vähemalt ühes uuritava ainega nõus ja ühes kontrollnõus omastamisfaasi ja eraldumisfaasi alguses ja lõpus; väljendatakse NH_4^+, NH_3 või üldlämmastiku milligrammidena liitris.

Usside, sette ja vee proovide võtmine ja analüüsimine

Proovivõtu ajakava

53. 28-päevase omastamisfaasi ja 10-päevase eraldumisfaasi proovivõtu ajakavade näidised on esitatud 3. liites.

54. Katsekambritest võetakse vee- ja setteproov, et määrata uuritava aine kontsentratsioon enne usside lisamist ning omastamisfaasi ja eraldumisfaasi ajal. Katse ajal määratakse uuritava aine kontsentratsioonid ussides, settes ja vees, et jälgida uuritava aine jaotumist katsesüsteemi osades.

55. Usside, sette ja vee proovid võetakse vähemalt kuuel korral nii omastamisfaasi kui ka eraldumisfaasi ajal.

56. Jätkake proovide võtmist kuni platoo (statsionaarse oleku) saabumiseni (vt 1. liide) või 28 päeva jooksul. Kui 28 päevaga ei ole platooni jõutud, alustage eraldumisfaasi. Eraldumisfaasi alustamiseks kandke selleks määratud ussid paralleelkatse kambritesse, milles on rikastamata sete ja vesi (vt ka punktid 17 ja 18).

Proovi võtmine ja proovi ettevalmistamine

57. Dekanteerimise, sifooni või pipeti abil võetakse veest proovid, mille maht on piisav uuritava aine koguse määramiseks proovis.

58. Ülejäänud veekiht eemaldatakse katsekambritest hoolikalt dekanteerimise või sifooni abil. Sette proovid tuleks võtta ettevaatlikult, et usse võimalikult vähe häirida.

▼M6

59. Eemaldage proovivõtmise ajaks paralleelkatsenõust kõik ussid, näiteks nii, et suspendeerite sette katvas veekihis ja kallate iga paralleelkatse laia madalasse nõusse, millelt saab ussid ära korjata pehmete teraspintsettidega. Loputage neid kiiresti veega madalas klaas- või terasnõus. Eemaldage liigne vesi. Tõstke ussid ettevaatlikult eelnevalt kaalutud nõusse ja kaaluge nad. Surmake ussid külmutamise teel (nt ≤ – 18 °C). Registreerida tuleks kookonite ja/või noorjärkude olemasolu ja arv.

60. Üldiselt tuleks ussid pärast proovi võtmist otsekohe kaaluda ja surmata, ootamata soolestiku tühjendamise faasi, et saada konservatiivne BAF, mis hõlmab ka saastatud soolesisaldist, ning hoida ära kehajääkide kaod, mis võiksid tekkida soolestiku tühjendamisel üksnes vees (8). Aine puhul, mille log K_{ow} on suurem kui 5, ei ole aine eraldumine soolestiku tühjendamise aja jooksul üksnes vees tõenäoline, samas kui aine puhul, mille log K_{ow} on väiksem kui 4, võivad kaod olla olulised (47).

61. Eraldumisfaasi ajal tühjendavad ussid oma soolestiku puhtasse settesse. See tähendab, et mõõtmistel vahetult enne eraldumisfaasi hõlmavad tulemused ka soolestikus olevat saastunud setet, kuid pärast eraldumisfaasi esimese 4–24 tunni möödumist on enamik soolestiku saastunud sisust asendatud puhta settega (11, 47). Sellises proovis võib kontsentratsiooni ussides käsitada kontsentratsioonina usside kudedes pärast soolestiku tühjendamist. Saastamata settest tingitud uuritava aine kontsentratsiooni lahjenemise arvessevõtmiseks eraldumisfaasis võib hinnata soolesisu massi selliste suhtarvudega nagu usside märgmass / usside tuha mass või usside kuivmass / usside tuha mass.

62. Kui konkreetse uuringu eesmärk on mõõta biokättesaadavust ja tegelikku jääkide sisaldust ainega kokkupuutunud katselooma kudedes, tuleks võtta vähemalt ainega kokkupuutunud katseloomade osaproov (nt kolmest täiendavat paralleelkatsenõust), eelistatavalt statsionaarse oleku ajal, see tuleks kaaluda, lasta tühjendumiseks seista puhtas vees kuni 6 tundi (47) ning kaaluda uuesti enne analüüsi. Andmeid usside massi ja aine sisalduse kohta kudedes, mis saadakse sellest osaproovist, saab siis võrrelda väärtustega, mis leiti usside puhul, kellel ei lastud soolestikku tühjendada. Ussidel, kes on ette nähtud eraldumise mõõtmiseks, ei tuleks lasta end tühjendada enne üleviimist puhtasse settesse, et mitte tekitada neile asjatut stressi.

63. Vee, sette- ja ussiproove tuleks eelistatavalt analüüsida kohe pärast eraldamist (s.o 1–2 päeva jooksul), et vältida lagunemist või muid kadusid, ja arvutada juba katse vältel ligikaudsed omastamis- ja eraldumiskiirused. Kohene analüüs hoiab ära ka viivituse platoo saavutamise määramisel.

64. Kui kohene analüüs ei ole võimalik, tuleks proove säilitada sobivates tingimustes. Enne katse alustamist tuleks hankida teavet konkreetse uuritava aine stabiilsuse ja nõuetekohase säilitamise tingimuste kohta (nt säilitamistemperatuur ja -aeg, ekstraktsioonimeetodid jne). Kui selline teave ei ole kättesaadav ja seda peetakse vajalikuks, võib rikastatud kudedega teha kontrollkatse, et määrata stabiilsus säilitamisel.

Analüüsimeetodi kvaliteet

65. Kuna kogu meetodi täpsuse määravad peamiselt uuritava aine määramiseks kasutatava analüüsimeetodi mõõtetäpsus, kordustäpsus ja tundlikkus, tuleb eksperimentaalselt kontrollida, kas keemilise analüüsi täpsus ja korratavus ning uuritava aine eraldamine vee, sette ja usside proovidest vastavad selle meetodi tingimustele. Samuti tuleks jälgida, et kontrollkatsekambrites ei

▼M6

oleks uuritava aine kontsentratsioon kõrgem tausttasemest. Vajaduse korral tuleb C_w, C_s ja C_a väärtustesse viia sisse parandid aine eraldamise puuduliku saagise ja kontrollkatsete tausttaseme arvestamiseks. Kogu katse vältel tuleb kõiki proove käidelda nii, et minimeerida saastumine ja kaod (näiteks kaod, mida tekitab uuritava aine adsorbeerumine proovivõtuseadmele).

66. Tuleks registreerida uuritava kemikaali üldsaagis, saagis ussidest, settest ja veest ning aurunud uuritava kemikaali püüdmiseks kasutatud absorbente sisaldavast püüdurist (kui kasutati) ja esitada katseprotokollis.

67. Kuna soovitatakse kasutada radioaktiivse märgisega aineid, on võimalik analüüsida kogu radioaktiivsust (st lähteainete ja lagunemissaaduste radioaktiivsus). Kui analüüsimeetod seda võimaldab, pakub olulist teavet uuritava lähtekemikaali ja metaboliitide kvantitatiivne määramine statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus. Kui kavatsetakse teha selliseid mõõtmisi, tuleks proove sobiva meetodiga ekstraheerida, et lähteühendi sisalduse saaks määrata eraldi. Kui leitud lagunemissaadus moodustab olulise protsendi (nt > 10 %) katseloomas mõõdetud radioaktiivsusest statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus, on soovitatav selline lagunemissaadus kindlaks teha (5).

68. Väikse biomassi tõttu ei ole sageli võimalik määrata uuritava aine kontsentratsiooni igas üksikus ussis, kui katseloomana ei kasutata *Branchiura sowerbyi*'t (mille isendi märgkaal on 40–50 mg) (11). Seetõttu on lubatav koondada ühest katsenõust võetud isendid üheks prooviks, kuid see piirab statistilisi meetodeid, millega on võimalik andmeid töödelda. Kui teatud statistilist meetodit ja võimsust peetakse tähtsaks, tuleb katses kasutada piisaval arvul katseloomi ja/või paralleelseid katsekambreid, et tagada soovitud andmete koondamine ja täita statistilise meetodi ja võimsusega seotud nõudeid.

69. On soovitatav väljendada bioakumulatsioonitegur BAF nii summaarse märgmassi kui ka summaarse kuivmassi funktsioonina ning vajaduse korral (näiteks väga lipofiilse aine puhul) lipiidisisalduse ja sette orgaanilise süsiniku üldsisalduse funktsioonina. Lipiidisisalduse määramiseks tuleks kasutada sobivaid meetodeid (48, 49). Standardmeetodina (48) võib soovitada ekstraheerimist kloroformi/metanooliga (50). Klooritud lahustite kasutamise vältimiseks võiks siiski kasutada Bligh' ja Dyeri meetodi (50) muudetud versiooni (51), mis on kontrollitud laboritevahelises ringkatses. Kuna eri meetodid ei pruugi anda sama tulemust (48), on tähtis, et kasutatud meetod oleks põhjalikult kirjeldatud. Võimaluse korral, s.o kui usside kude on piisavalt, tuleks lipiidid määrata samast proovist või ekstraktist, mida kasutati uuritava aine analüüsiks, kuna lipiidid tuleb ekstraktist sageli kõrvaldada, enne kui ekstrakti on võimalik kromatograafiliselt analüüsida (5). Siiski on lipiidisisalduse mõõtmiseks otstarbekas kasutada kohanenud kontroll-loomi näiteks kolmest proovist vähemalt omastamisfaasi alguses või eelistatavalt lõpus.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

70. Uuritava kemikaali omastamise kõvera saamiseks kantakse aritmeetilises skaalas graafikule uuritava aine kontsentratsioon ussides/ussidel omastamisfaasis

▼M6

sõltuvana ajast. Kui kõver on jõudnud platoole, arvutage statsionaarse oleku BAF_{ss}:

$$\frac{C_a \text{ stats. olekus või 28. päeval (keskmine)}}{C_s \text{ stats. olekus või 28. päeval (keskmine)}}$$

71. Määrake kineetiline bioakumulatsioonitegur (BAF_K) suhtena k_s/k_e. Eraldumise kiiruskonstant (k_e) määratakse tavaliselt eraldumise kõvera alusel (s.o eraldumisfaasis ussides leiduva uuritava aine kontsentratsiooni graafikust). Omastamise kiiruskonstant k_s arvutatakse omastamiskõvera kineetikast. Kineetilise bioakumulatsioonitegur ja kiiruskonstantide k_s ja k_e saamiseks eelistatud meetod on andmete töötlemine arvutiga, kasutades mittelineaarseid parameetri hindamise meetodeid (vt 2. liide). Kui aine eraldumine selgelt ei ole esimest järku, tuleks kasutada keerukamaid mudeleid (25, 27, 52).

72. Elustiku-sette akumulatsioonitegur (*biota-sediment accumulation factor*, BSAF) määratakse BAF_K normeerimisega, võttes arvesse usside lipiidisisaldust ja sette orgaanilise süsiniku üldsisaldust.

Tulemuste tõlgendamine

73. Tulemuste tõlgendamisel peab olema ettevaatlik, kui katses mõõdetud kontsentratsioonitasemed on analüüsimeetodi määramispiiri ligidal.

74. Selgelt määratletud omastamis- ja eraldumiskõverad viitavad hea kvaliteediga bioakumulatsiooni andmetele. Üldiselt ei tohiks hästi kavandatud katse puhul bioakumulatsiooniteguri usalduspiirid ületada 25 % (5).

Katseprotokoll

75. Katseprotokollis tuleb esitada järgmine teave:

Uuritav aine

— füüsikaline olek ja füüsikalis-keemilised omadused, näiteks log K_{ow}, lahustuvus vees;

— kemikaali identifitseerimisandmed; uuritava aine päritolu, kasutatud lahusti nimetus ja kontsentratsioon;

— radioaktiivse märgisega aine puhul: märgistatud aatomite täpne asukoht, eriradioaktiivsus ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsent.

Katses kasutatud liik

— teaduslik nimetus, liin, päritolu, kõik eeltöötlused, aklimatiseerumine, vanus, suuruse vahemik jms.

Katsetingimused

— kasutatud katsemeetod (nt staatiline, poolstaatiline või läbivoolukatse);

— kasutatud valgustuse tüüp ja omadused ning valgustuse kestus(ed);

— katse kava (nt katsekambrite arv, materjal ja suurus, veekihi maht, settekihi mass ja maht, veemahu asendamise kiirus (poolstaatilise või läbivoolukatse puhul), aeratsioon enne katset ja katse ajal, paralleelkatsete arv, usside arv igas paralleelkatses, uuritava aine kontsentratsioonide arv, omastamisfaasi ja eraldumisfaasi kestus, proovivõtmise sagedus);

▼**M6**

— uuritava aine ettevalmistamise ja kasutamise meetod ning samuti konkreetse meetodi valimise põhjused;

— nominaalsed uuritavad kontsentratsioonid;

— tehisvee ja -sette koostisosade allikas või looduslike keskkondade kasutamise puhul vee ja sette päritolu, eeltöötluste kirjeldus, tõendid (katsetulemused) selle kohta, et katseloomad suudavad elada ja paljuneda kasutatavas keskkonnas, sette omadused (pH ja poorivee ammoniaagisisaldus (looduslik sete), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC), osakeste suurusjaotus (liiva, tolmu ja savi protsent), veesisaldus, ja muud tehtud mõõtmised) ja vee omadused (pH, karedus, elektrijuhtivus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloori jääktasemed (kui mõõdeti) ja muud tehtud mõõtmised);

— tehissette nominaalne ja mõõdetud kuivmass protsendina märgmassist (või kuivmassi-märgmassi suhtarv); loodusliku sette mõõdetud kuivmass protsendina märgmassist (või kuivmassi-märgmassi suhtarv);

— katsekambrites oleva vee kvaliteet: temperatuur, pH, ammoniaagisisaldus, üldkaredus ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;

— üksikasjalik teave vee-, sette- ja ussiproovide töötlemise kohta, sh andmed uuritava aine ettevalmistamise, säilitamise, rikastamismeetodite, ekstraheerimis- ja analüüsimeetodite (ning täpsuse) kohta ning lipiidisisalduse kohta ja uuritava aine analüüsisaagiste kohta.

Tulemused

— kontrollrühma usside ja iga katsekambri usside suremus ning muu täheldatud subletaalne toime, sealhulgas ebatavaline käitumine (näiteks sette vältimine, fekaalikübemete olemasolu või puudumine, mittepaljunemine);

— sette ja katseorganismide mõõdetud kuivmassi ja märgmassi suhtarv (mis on vajalik normeerimise jaoks);

— usside lipiidisisaldus;

— kõverad, mis näitavad uuritava aine omastamise ja eraldumise kineetikat ussides ning statsionaarse olekuni jõudmiseks vajalikku aega;

— C_a, C_s ja C_w (vajaduse korral koos standardhälbe ja usaldusvahemikuga) kõikide proovivõtuaegade jaoks (C_a, g/kg, väljendatakse kogu keha märg- ja kuivmassi kohta, C_s, g/kg, väljendatakse sette märg- ja kuivmassi kohta, ja C_w, mg/l). Kui on vaja määrata elustiku-sette akumulatsioonitegur (BSAF; mõiste vt 1. liide) (näiteks eri lipiidisisaldusega loomadega tehtud katsete tulemuste võrdlemiseks), peaks C_a olema väljendatud ka g-des organismi lipiidisisalduse kg kohta ja C_s peaks olema väljendatud g-des sette orgaanilise süsiniku kg kohta;

— BAF (sette märgkaalu kg / usside märgkaalu kg), sette omastamise kiiruskonstant k_s (sette märgkaalu g / usside märgkaalu kg / päev), ja eraldumise kiiruskonstant k_e (1/päev); lisaks võib teatada ka elustiku-sette akumulatsiooniteguri BSAF (sette orgaanilise süsiniku kg / usside lipiidisisalduse kg);

▼**M6**

— eraldumata jäänud jäägid (*non-eliminated residues*, NER) eraldumisfaasi lõpus;

— kui mõõdeti: lähteaine, lagunemissaaduste ja seotud jääkide protsent (seotud jäägid – uuritav aine, mida ei ole võimalik ekstraheerida tavaliste ekstraheerimismeetodite abil), mis on tuvastatud katseloomades;

— meetodid, mida kasutatakse andmete statistilise analüüsi jaoks.

Tulemuste hindamine

— tulemuste vastavus nõuetekohasuse kriteeriumidele, mis on loetletud punktis 21;

— ootamatud või ebatavalised tulemused, näiteks uuritava aine mittetäielik eraldumine katseloomadest; sellisel juhul kõikide varasemate uuringute tulemused, mis võivad anda kasulikku teavet.

▼M6

1. liide

Mõisted ja ühikud

Tehissete, spetsiaalselt valmistatud sete, taastatud, või sünteetiline sete – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks;

Bioakumulatsioon – uuritava aine kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismi peal, võrreldes uuritava aine kontsentratsiooniga ümbritsevas keskkonnas. Bioakumulatsioon on biokontsentratsiooni ja biomagnifikatsiooni (vt allpool) tulemus.

Bioakumulatsioonitegur (BAF) – uuritava aine kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismi peal (C_a, g-des·ussi märg- või kuivmassi kg kohta) kõnealuse bioakumulatsiooni katse omastamisfaasis igal ajamomendil, jagatud aine kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas (C_s, g-des sette märg- või kuivmassi kg kohta). Selleks, et BAF oleks kooskõlas C_a ja C_s ühikutega, on BAFi ühik sette kg / usside kg (15).

Bioakumulatsioonitegureid, mis arvutatakse otse settest omastamise kiiruskonstandi jagamisel eraldumise kiiruskonstantidega (k_s ja k_e, vt allpool), nimetatakse kineetilisteks bioakumulatsioonitegurikes (BAF_K).

Biokontsentratsioon – uuritava aine kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismi peal, võrreldes uuritava aine kontsentratsiooniga ümbritsevas keskkonnas, mis tuleneb üksnes aine omastamisest keha pinna kaudu.

Biomagnifikatsioon – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismi peal, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga söödas või saagis, mis tuleneb peamiselt saastunud sööda või saagi kaudu omastamise teel. Biomagnifikatsioon võib viia uuritava aine ülekandumise või kogunemiseni toitumisvõrgustikes.

Elustiku-sette akumulatsioonitegur (BSAF) – lipiidide suhtes normeeritud uuritava kemikaali statsionaarse oleku kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismil, jagatuna uuritava aine orgaanilise süsiniku suhtes normeeritud kontsentratsiooniga settes statsionaarses olekus. C_a väljendatakse siis g-des·organismi lipiidide kg kohta ja C_s g-des sette orgaanilise aine kg kohta.

Konditsioneerimisperiood – periood, mida kasutatakse sette mikroobse osa stabiliseerimiseks ja näiteks settekomponentide poolt eraldatava ammoniaagi eemaldamiseks; see on ajavahemik enne sette rikastamist uuritava ainega. Tavaliselt visatakse kattev veekiht pärast konditsioneerimist ära.

Uuritava aine **eraldumine** – aine kadumine katseorganismi kudedest aktiivsete või passiivsete protsesside tõttu, mis toimivad sõltumatult uuritava aine olemasolust või puudumisest ümbritsevas kasvukeskkonnas.

Eraldumisfaas – aeg, mis järgneb katseorganismide ülekandmisele uuritava ainega rikastatud kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda, mille vältel uuritakse aine eraldumist (või netokadu) katseorganismidest.

Eraldumise kiiruskonstant (k_e) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni vähenemise kiirus katseorganismil/katseorganismis pärast katseorganismide ülekandmist uuritavat ainet sisaldavast kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda; k_e ühik on d^{-1} (kus d = päev).

▼M6

Tasakaalustamisaega kasutatakse selleks, et lasta uuritaval ainel jaotuda tahke faasi, poorivee ja katva veekihi vahel; see toimub pärast sette rikastamist uuritava ainega ja enne katseorganismide lisamist.

Oktanooli-vee jaotuskoefitsient (K_{ow}) – aine *n*-oktanoolis ja vees lahustuvuse suhe tasakaaluolekus; vahel tähistatakse seda jaotuskoefitsienti ka P_{ow}-ga. K_{ow} logaritmi (log K_{ow}) kasutatakse kui aine veeorganismidesse kogunemise (bioakumulatsiooni) võime üht näitajat.

Orgaanilise süsiniku-vee jaotuskoefitsient (K_{oc}) – tasakaaluolekut iseloomustav suhtarv, mille leidmiseks jagatakse aine kontsentratsioon mulla orgaanilise süsiniku fraktsioonis/fraktsioonil aine kontsentratsiooniga vees.

Kattev veekiht – vesi, mis on katsenõus sette peal.

Platoo või **statsionaarne olek** – määratletud kui tasakaaluolek omastamise ja eraldumise protsesside vahel, mis toimuvad kokkupuutefaasis ühel ja samal ajal. Statsionaarne olek bioakumulatsiooniteguri ajast sõltuvuse graafikul on saavutatud siis, kui kõver on igal proovivõtuajal ajateljega paralleelne ja vähemalt kahepäevase vahemikuga võetud proovide bioakumulatsiooniteguri kolme järjestikuse analüüsi tulemused on üksteise suhtes 20 % piires ning kolme proovivõtu ajavahemiku vahel ei ole statistiliselt olulisi erinevusi. Uuritava kemikaali puhul, mida omastatakse aeglaselt, oleksid sobivamad seitsmepäevased ajavahemikud (5).

Poorivesi – vesi, mis asub sette- või mullaosakeste vahelises ruumis.

Settest omastamise kiiruskonstant (k_s) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni suurenemise kiirus katseorganismis/katseorganismi peal, mille on põhjustanud omastamine settefaasist; k_s mõõdetakse g setteid kg usside ja päeva kohta.

Rikastatud sete – sete, millele on lisatud uuritavat ainet.

Statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur (BAF_{ss}) – bioakumulatsioonitegur statsionaarse oleku puhul, see ei muutu oluliselt pika ajavahemiku jooksul; uuritava aine kontsentratsioon ümbritsevas kasvukeskkonnas (C_s, g-des sette märg- või kuivmassi kg kohta) on selle ajavahemiku vältel konstantne.

Omastamis- või kokkupuutefaas – aeg, mille vältel katseorganismid puutuvad kokku uuritava ainega.

▼M6

2. liide

Omastamise ja eraldumise parameetrite arvutamine

Bioakumulatsiooni katse peamine näitaja on bioakumulatsioonitegur, BAF. Bioakumulatsiooniteguri saab mõõtmistulemustest arvutada, kui jagada statsionaarses olekus uuritava aine kontsentratsioon katseorganismis C_a uuritava aine kontsentratsiooniga settes C_s. Kui omastamisfaasi ajal statsionaarse olekuni ei jõuta, arvutatakse bioakumulatsioonitegur samal viisil 28. päeva jaoks. Siiski tuleks ära märkida, kas bioakumulatsioonitegur põhineb statsionaarse oleku kontsentratsioonidel või mitte.

Tavapärane meetod kineetilise bioakumulatsiooniteguri (BAF_K), settest omastamise kiiruskonstandi (k_s) ja eraldumise kiiruskonstandi (k_e) leidmiseks on kasutada arvutitöötluses mittelineaarseid parameetri hindamise meetodeid. Kui meil on keskmiste akumulatsioonitegurite aegrida (C_a, keskmised väärtused igal proovivõtu kuupäeval / C_s, keskmised väärtused igal proovivõtu kuupäeval = AF) omastamisfaasis, mis põhineb usside ja sette märgkaalul, ning mudeli võrrand

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[võrrand 1]}$$

kus AF(t) on suhtarv, mille saamiseks jagatakse uuritava aine kontsentratsioon ussides uuritava aine kontsentratsiooniga settes omastamisfaasi igal ajahetkel t, saab arvutiprogrammidega arvutada BAF_K, k_s ja k_e väärtused.

Kui omastamisfaasi vältel jõutakse statsionaarse olekuni (s.o $t = \infty$), võib võrrandi 1 lihtsustada järgmiselt:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[võrrand 2]}$$

kus

k_s = kudedesse omastamise kiiruskonstant [g setteid kg usside ja päeva kohta];

k_e = eraldumise kiiruskonstant [d^{-1}]

Sel juhul on $k_s/k_e \times C_s$ üks lähenemisviis uuritava aine kontsentratsiooni leidmiseks usside kudedes statsionaarses olekus ($C_{a,ss}$).

Elustiku-sette akumulatsioonitegur (BSAF) tuleks arvutada järgmiselt:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

kus f_{oc} on sette orgaanilise süsiniku fraktsioon ja f_{lip} on usside lipiidifraktsioon, mis on mõlemad kas kuivmassi või märgmassi kohta.

Kui meil on kontsentratsiooni väärtuste aegrida, saab eraldumise kineetikat modelleerida järgmiste mudeli võrranditega ja parameetrite mittelineaarse hindamise programmi abil.

Vaikimisi soovitatakse lähtepunktiks võtta mõõdetud keskmine jääkide kontsentratsioon usside kehas omastamisfaasi lõpus. Omastamisfaasist modelleeritud/hinnatud väärtust tuleks kasutada üksnes siis, kui näiteks mõõdetud väärtus erineb oluliselt mudelile vastavast aine sisaldusest kehas. Vt ka punkt 50, aine eraldumise uurimiseks määratud usside alternatiivne eelnev kokkupuude; selle lähenemisviisi puhul loetakse, et eelnevalt ainega kokkupuutunud usside proovid eraldumisfaasi 0-päeval annavad kehas sisalduva ainekoguse realistliku väärtuse, millest siis algab eraldumise kineetika.

▼M6

Kui aja järgi graafikule kantud andmepunktid näitavad pidevat eksponentsiaalset uuritava aine kontsentratsiooni vähenemist loomades, võib ajast sõltuva eraldumise kirjeldamiseks kasutada ühe-osa-mudelit (võrrand 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[võrrand 3]}$$

Eraldumisprotsessid näivad vahel olevat kahefaasilised: eraldumisfaasi alguses väheneb C_a kiiresti, kuid hiljem, eraldumise hilisemates järkudes muutub uuritava aine kadu aeglasemaks, vt näiteks (8, 19, 25). Kahte faasi on võimalik tõlgendada eeldusega, et organismis on kaks eraldi osa, millest uuritav aine kaob erineva kiirusega. Neil juhtudel tuleks vaadata asjakohaseid publikatsioone, näiteks (15, 16, 17, 25).

Kahest osast eraldumist saab näiteks kirjeldada järgmise valemi abil (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[võrrand 4]}$$

A ja B on osade suurused (protsendina kudedes olevate ainejääkide üldsisaldusest), kus A on osa, millest aine kaob kiiresti, ja B on osa, milles aine sisaldus väheneb aeglaselt. A ja B summa võrdub 100 protsendiga looma osade üldmahust statsionaarses olekus. k_a ja k_b kujutavad endast vastavaid eraldumise kiiruskonstante [d^{-1}]. Kui eraldumise kineetikat kirjeldatakse kahe osa mudeliga, võib omastamise kiiruskonstandi k_s määrata järgmiselt: (53, 54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[võrrand 5]}$$

Sellest hoolimata tuleks selliseid mudelvõrrandeid kasutades olla ettevaatlik, eelkõige kui katse ajal võib muutuda uuritava aine biosaadavus (42).

Alternatiivina eespool esitatud mudelvõrranditele võib kineetilised parameetrid (k_s ja k_e) arvutada ka korraga, kohaldades esimese järgu kineetika mudelit korraga kõigile omastamisfaasi ja eraldumisfaasi andmetele. Omastamise ja eraldumise kiiruskonstantide sellise kombineeritud arvutamise meetodi kirjeldus on esitatud publikatsioonides (55, 56 ja 57).

Eraldumata jäänud jäägid (*Non-Eliminated Residues*, NER) tuleks arvutada teisese olulise näitajana; selleks korrutatakse keskmine kontsentratsioon ussides (C_a) eraldumisfaasi 10. päeval, mis on jagatud keskmise kontsentratsiooniga ussides statsionaarses olekus (omastamisfaasi 28. päeval) (C_a), 100-ga:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ at the end of elimination}(average) \times 100}{C_a \text{ at steady state}(average)}}$$

▼M6

3. liide

Proovivõtu ajakava näide 28-päevase bioakumulatsiooni katse puhul

a) **omastamisfaas (sealhulgas 4-päevane tasakaalustumisfaas)**

Päev	Tegevused
– 6	Turbasuspensiooni ettevalmistamine sette tegemiseks; suspensiooni konditsioneerimine 48 h vältel.
– 4	Sette või settefraktsiooni rikastamine uuritava ainega; sette kõigi koostisosade segamine; setteproovide võtmine ainega töödeldud settest ja lahusti kontrolli settest uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; katva veekihi lisamine; inkubeerimine katsetingimustes (tasakaalustamisfaas).
– 3/– 2	Katseorganismide eraldamine kultuurist aklimatiseerumiseks.
0	Vee kvaliteedi mõõtmine (vt punkt 52); kõrvaldatakse paralleelkatsed, mis on ette nähtud vee- ja setteproovide võtmiseks ning uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks; usside jaotamine juhuslikkuse alusel katsekambritesse; piisava arvu usside alaproovide võtmine analüüsi taustnäitajate määramiseks. Õhuga varustatuse kontrollimine, kui kasutatakse suletud katsesüsteemi.
1	Kõrvaldatakse paralleelkatsed, mis on ette nähtud proovide võtmiseks; kontrollitakse õhuga varustatust, usside käitumist ja vee kvaliteeti (vt punkt 56); võetakse vee-, sette- ja usside proovid uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
2	Õhuga varustatuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
3	Sama kui päeval 1.
4–6	Sama kui päeval 2.
7	Sama kui päeval 1; vajaduse korral lisatakse vett aurustumise kompenseerimiseks.
8–13	Sama kui päeval 2.
14	Sama kui päeval 1; vajaduse korral lisatakse vett aurustumise kompenseerimiseks.
15–20	Sama kui päeval 2.
21	Sama kui päeval 1; vajaduse korral lisatakse vett aurustumise kompenseerimiseks.
22–27	Sama kui päeval 2.
28	Sama kui päeval 1; vee kvaliteedi mõõtmine (vt punkt 52); omastamisfaasi lõpp; usside piisavate alaproovide säilitamine analüüsi taustnäitajate, märg- ja kuivmassi ning lipiidisisalduse määramiseks; usside ülekandmine allesolevatest kemikaaliga kokkupuute paralleelkatsetest eraldumisfaasi jaoks puhast setet sisaldavatesse nõudesse (ilma soolestiku tühjendamiseta); vee-, sette- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollkatse rühmades; proovide võtmine püüdurlahustest, kui neid kasutatakse.
	Kokkupuute-eelsete tegevuste (tasakaalustamisfaasi) ajakava tuleks määrata aine omaduste põhjal. Vajaduse korral tuleb ettevalmistatud setet konditsioneerida katva veekihi all temperatuuril 20 ± 2 °C juures 7 päeva; sellisel juhul tuleb sette tegemist alustada varem.
	Päeva 2 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

▼**M6**

b) **Eraldumisfaas**

Päev	Tegevused
– 6	Turbasuspensiooni ettevalmistamine sette tegemiseks; suspensiooni konditsioneerimine 48 h vältel.
– 4	Sette kõigi koostisosade segamine; ainega töödeldud settest ja lahusti kontrolli settest setteproovide võtmine uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; katva veekihi lisamine; inkubeerimine katse tingimustes.
0 (omastamisfaasi 28. päev)	Vee kvaliteedi mõõtmise (vt punkt 52); usside ülekandmine allesolevatest ainega kokkupuute paralleelkatsetest puhast setet sisaldavatesse nõudesse; **4–6 tundi** hiljem kõrvaldatakse paralleelkatsed, mis on ette nähtud vee-, sette- ja usside proovide võtmiseks, et määrata uuritava aine kontsentratsioon; usside jaotamine juhuslikkuse alusel katsekambritesse.
1	Kõrvaldatakse paralleelkatsed proovide võtmiseks; kontrollitakse õhuga varustatust, usside käitumist ja vee kvaliteeti (vt punkt 52); võetakse vee-, sette- ja usside proovid uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
2	Õhuga varustatuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
3	Sama kui päeval 1.
4	Sama kui päeval 2.
5	Sama kui päeval 1.
6	Sama kui päeval 2.
7	Sama kui päeval 1; vajaduse korral lisatakse vett aurustumise kompenseerimiseks.
8–9	Sama kui päeval 2.
10	Sama kui päeval 1; eraldumisfaasi lõpp; vee kvaliteedi mõõtmine (vt punkt 52); vee-, sette- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollkatse rühmades; proovide võtmine püüdurlahustest, kui neid kasutatakse.
	Sette ettevalmistamine enne eraldumisfaasi tuleks teha samal viisil kui enne omastamisfaasi.
	Päeva 2 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

▼**M6**

4. liide

Mõned lahjendamiseks sobiva vee füüsikalis-keemilised omadused

KOOSTISOSA	KONTSENTRATSIOONID
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 µg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaanilised pestitsiidid, üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

TAASTATUD VEE SOOVITATAV KOOSTIS

a. Kaltsiumkloriidi lahus

Lahustage 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitrini.

b. Magneesiumsulfaadi lahus

Lahustage 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitrini.

c. Naatriumvesinikkarbonaadi lahus

Lahustage 2,59 g $NaHCO_3$ deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitrini.

d. Kaaliumkloriidi lahus

Lahustage 0,23 g KCl deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitrini.

Kõik kemikaalid peavad olema analüüsipuhtad.

Destilleeritud või deioniseeritud vee juhtivus ei tohiks ületada 10 μScm^{-1}.

25 ml iga lahust a kuni d segatakse ja ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Selles lahuses on kaltsium- ja magneesiumioonide kontsentratsioonide summa 2,5 mmol/l.

Ioonide suhtarv Ca:Mg on 4: 1 ning Na:K on 10:1. Selle lahuse puhvermahtuvus happe neutraliseerimisel $K_{S4.3}$ on 0,8 mmol/l.

Lahjendusvett aereeritakse, kuni on saavutatud vee küllastumine hapnikuga, seejärel hoitakse seda enne kasutamist umbes kaks päeva ilma edasise aereerimiseta.

Sobiva lahjendusvee pH peaks olema vahemikus 6–9.

▼M6

5. liide

Tehissete – soovitused valmistamise ja säilitamise kohta

Erinevalt katsemeetodist C.8 (40), milles soovitatakse tehissettes kasutada turbasisaldust 10 % kuivmassist, kasutatakse käesolevas meetodis tehissettes turbasisaldust 2 %, et see vastaks looduslike setete väiksele kuni keskmisele orgaanilise aine sisaldusele (58).

Kuivkomponentide protsendiline sisaldus tehissettes:

Koostisosa	Kirjeldus	% kuivas settes
Turvas	Turbasamblaturvas, lagunemisaste: „keskmine", õhu käes kuivatatud, ilma nähtavate taimejäänusteta, peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Kvartsliiv	Tera suurus: ≤ 2 mm, kuid > 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm	76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisisaldus ≥ 30 %	22 ± 1
Söödaallikas	*Folia urticae*, *Urtica* sp. (kõrvenõgese) peeneks jahvatatud lehed (osakese suurus ≤ 0,5 mm), või *Urtica* sp. jahvatatud lehed segus α-tselluloosiga (1: 1); vastavalt farmaatsia nõuetele ja inimtervishoius ettenähtud kvaliteediga; lisaks kuivale settele	0,4–0,5 %
Kaltsiumkarbonaat	$CaCO_3$, pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas, lisaks kuivale settele	0,05–1
Deioniseeritud vesi	Juhtivus ≤ 10 μS/cm, lisaks kuivale settele	30–50

Kui võib eeldada suurenevat ammoniaagisisaldust, näiteks kui uuritav aine on teadaolevalt nitrifikatsiooni inhibiitor, võib olla otstarbekas asendada 50 % lämmastikurikast nõgesepulbrit tselluloosiga (nt α-tselluloosi pulber, keemiliselt puhas, osakese suurus ≤ 0,5 mm).

Valmistamine

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks (tera suurus on ≤ 0,5 mm, nähtavad taimeosad puuduvad). Vajalik kogus turbapulbrit suspendeeritakse deioniseeritud vees, mis lisatakse kuivale settele (on leitud, et kui veekogus ületab turba kuivmassi 11,5 korda, saadakse hästi segatav turbakört (8)), kasutades tõhusat homogenisaatorit.

Selle suspensiooni pH reguleeritakse $CaCO_3$ abil vahemikku 5,5 ± 0,5. Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks ööpäeva temperatuuril 20 ± 2 °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent. Segu pH mõõdetakse uuesti ja reguleeritakse vajaduse korral $CaCO_3$ abil vahemikku 6,0 ± 0,5. Seejärel segatakse kogu suspensioon muude kuivade koostisosadega, võttes arvesse koostisosi, mida kasutati rikastamiseks. Lisatakse ülejäänud deioniseeritud vesi, et saada homogeenne sete. pH mõõdetakse uuesti ja reguleeritakse vajaduse korral $CaCO_3$ abil vahemikku 6,5–7,5. Kui eeldatakse ammoniaagi moodustumist, võib olla kasulik hoida sademe pH allpool 7,0 (nt 6,0 ja 6,5 vahel). Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Kui eeldatakse ammoniaagi moodustumist, võib tehissetet konditsioneerida seitse päeva samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus (nt sette-vee suhe 1:4, settekihi paksus samasugune kui katsenõudes) enne, kui setet hakatakse rikastama uuritava ainega, st see peab olema kaetud veega, mida tuleb aereerida. Konditsioneerimisperioodi lõpus tuleks kattev veekiht eemaldada ja ära visata. Võetakse sette proovid (nt kolm proovi), et määrata kuivmass ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus.

▼M6

Seejärel segatakse iga kontsentratsioonitaseme settesse rikastatud kvartsliiv, sete jaotatakse paralleelkatsenõudesse ja lisatakse kattev veekiht (nt sette-vee suhe 1:4 settekihi paksus samasugune kui katsenõudes). Nõusid inkubeeritakse seejärel samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus. See on tasakaalustumisperioodi algus. Katvat veekihti tuleks aereerida.

Valitud söödaallikas tuleks lisada enne sette rikastamist uuritava ainega või rikastamise ajal. Selle võib kohe alguses segada turbasuspensiooniga (vt eespool). Söödaallika liigset lagunemist enne katseloomade lisamist, nt pika tasakaalustamisperioodi ajal, saab vältida aga sellega, et aeg söödaallika lisamise ja kokkupuute alguse vahel tehakse võimalikult lühikeseks. Selleks et tagada sööda piisav kokkupuude uuritava ainega, tuleks söödaallikas segada settega hiljemalt sel päeval, kui sete rikastatakse uuritava ainega. Erandeid võib teha juhul, kui tasakaalustumisperioodi pikkuse tõttu jõuaks liiga suur osa söödast mikroobselt laguneda enne katseorganismide lisamist. Võetakse sette proovid (nt kolm proovi rikastatud settest või kontrollkatsest), et määrata kuivmass ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus.

Muude koostisainete (turvas, liiv, kaoliin) kuivmass tuleks esitada grammides ja massiprotsendina kogu kuivainest.

Kuivkomponentidele sette valmistamise ajal lisatava vee ruumala tuleks samuti esitada protsendina kuivaine üldmassist (nt 100 % kuivmassi + 46 % vett tähendab, et 1 000 g kuivmassile lisatakse kokku 460 ml vett, mille tulemusena saadakse 1 460 g märga setet).

Säilitamine

Tehisliku sette kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Valmistatud märga setet võib säilitada (üksnes edasiseks kasutamiseks katseloomade kasvukultuuris) 4 ± 2 °C juures pimedas 2–4 nädalat alates valmistamise päevast (8).

Uuritava ainega rikastatud setet tuleks kasutada viivitamata, v.a juhul, kui on andmeid selle kohta, et konkreetset setet saab säilitada ilma uuritava aine mürgisust ja biosaadavust mõjutamata. Rikastatud sette proove võib säilitada kuni analüüsini konkreetse uuritava aine jaoks soovitatavates tingimustes.

▼M6

6. liide

Bioakumulatsiooni uurimiseks soovitatavad väheharjasusside liigid

Harilik mudatupp (*Tubifex tubifex* (MÜLLER)), mudatuplaste sugukond (*Tubificidae)*, alamklass väheharjasussid (*Oligochaeta)*

Väheharjasusside (*Oligochaeta*) hulka kuuluva mudatuplaste perekonna (*Tubificidae*) esindaja harilik mudatupp *Tubifex tubifex* (Müller) elab mageveesetetes torudes, mis on vooderdatud limaga. Mudatupp elab nendes torudes pea alaspidi, neelates setteosakesi ja kasutades nende küljes olevaid mikroorganisme ja orgaanikapudemeid. Mudatupe keha tagumine osa tavaliselt lookleb katvas veekihis, et hõlbustada hingamist. Kuigi see liik elutseb paljudes settetüüpides üle kogu põhjapoolkera, eelistab mudatupp suhteliselt peeneteralist muda (59). Selle liigi sobivust ökotoksikoloogilisteks katseteks on kirjeldatud näiteks järgmistes publikatsioonides (8, 29, 31, 39, 60, 62, 63).

Kultuuris pidamise meetodid

Bioakumulatsiooni katsete tegemiseks piisava arvu mudatuppede (*Tubifex tubifex*) saamiseks võib usse pidada laboris püsikultuuris. Mudatupe kultuuris pidamiseks soovitatakse (8) katsemeetodis C.8 (40) kirjeldatud tehismullal ja katsemeetodis C.1 kirjeldatud taastatud veel põhinevat süsteemi.

Kultuuri saab pidada klaasist või roostevabast terasest mahutites, mille kõrgus on 12–20 cm. Igasse kultuurinõusse pannakse kiht märga tehissetet, mille valmistamist on kirjeldatud 5. liites. Settekihi paksus peaks võimaldama ussidel järgida oma tavalist kaevamiskäitumist (mudatupel vähemalt 2 cm). Süsteemi lisatakse taastatud vett. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida sette häirimist. Veefaasi aereeritakse kergelt (nt 2 mulli sekundis läbi 0,45 μm filtri lastud õhku) Pasteuri pipeti abil, mis on paigutatud 2 cm kõrgemale sette pinnast. Kultuuri soovitatav temperatuur on 20 ± 2 °C.

Ussid lisatakse kultuurisüsteemi maksimumkoormusega 20 000 isendit sette pinna ruutmeetri kohta. Suurem koormus võib põhjustada kasvu- ja paljunemiskiiruse vähenemist (43).

Tehissette kultuuris tuleb usse sööta. Täiendavaks söödaallikaks sobib peeneksjahvatatud kalasööt TetraMin® (8); Klerks 1994, erakirjavahetus. Söötmine peaks olema piisav kasvu ja paljunemise tagamiseks ning hoidma ammoniaagi kuhjumise ja seente kasvu minimaalse. Sööta võib lisada kaks korda nädalas (nt 0,6–0,8 mg sette pinna ruutsentimeetri kohta). Praktilised kogemused on näidanud, et ühtlast sööda jaotumist kultuurinõus üle kogu sette pinna aitab tagada deioniseeritud vees valmistatud ja homogeenitud söödasuspensiooni kasutamine.

Ammoniaagi kuhjumise vältimiseks tuleks katvat veekihti vahetada läbivoolusüsteemi kasutamisega või vähemalt üks kord nädalas käsitsi. Setet tuleks tüvikultuuris vahetada iga kolme kuu tagant.

Usside proovide võtmiseks kultuurist võib kultuuri setet sõeluda läbi 1 mm avadega sõela, kui vaja on üksnes täiskasvanud usse. Kookonite kinnipidamiseks on vaja kasutada 0,5 mm avaga sõela ja noorjärkude kinnipidamiseks 0,25 mm avaga sõela. Sõelad võib panna taastatud vette pärast seda, kui sete on neist läbi läinud. Ussid lahkuvad sõelalt ja neid võib siis noppida veest pehmete teraspintsettide või tulel poleeritud otsaga pipeti abil.

▼M6

Katse tegemiseks või uue kultuuri alustamiseks kasutatakse üksnes vigastamata ja kindlalt määratud mudatupe *Tubifex tubifex* isendeid (vt näiteks (64)). Haiged või vigastatud ussid, samuti seeneniitidega nakatunud kookonid tuleb ära visata.

Sünkroniseeritud kultuurist võib saada teatud vanuses usse sobivate ajavahemike järel, kui soovitakse. Uued kultuuri kasvunõud seatakse valmis valitud ajavahemike järel (nt iga kahe nädala tagant) ja alustatakse teatavas vanuses loomadest (nt kookonitest). Siin kirjeldatud kasvatustingimuste puhul saavad ussid täiskasvanuks 8–10 nädala pärast. Kultuurist saab hakata usse võtma, kui ussid on munenud uued kookonid, näiteks kümne nädala pärast. Võetud täiskasvanud usse saab kasutada katsete tegemiseks ja kookoneid võib kasutada uue kultuuri alustamiseks.

Rabeliimukas (*Lumbriculus variegatus* (MÜLLER)), sugukond rabeliimuklased (*Lumbriculidae)*, alamklass väheharjasussid (*Oligochaeta)*

Rabeliimukas *Lumbriculus variegatus* (*Lumbriculidae*, *Oligochaeta*), elab samuti mageveesetetes üle kogu maailma ja seda kasutatakse laialdaselt ökotoksikoloogiakatsetes. Teavet tema bioloogia, kasvatustingimuste ja tundlikkuse kohta võib saada publikatsioonidest (1, 6, 9, 36). Rabeliimukat võib samuti kasvatada mudatupe jaoks soovitatud tehissettes (8), kuid on teatavad piirangud. Kuna looduses eelistab rabeliimukas jämedamat setet kui mudatupp, võib rabeliimuka kultuur mudatupe puhul kasutatud settes 4–6 kuu pärast välja surra. Praktilised kogemused on näidanud, et rabeliimukat võib kasvatada liivasel põhjal/substraadil (nt kvartsliiv, peen kruus) läbivooluga süsteemis, kasutades söödaallikana kalasööta mitu aastat järjest, ilma substraati uuendamata. Rabeliimuka suur eelis muude vee väheharjasussiliikide ees on kiire paljunemine, mille tulemusena laborikultuuri biomass suureneb kiiresti (1, 6, 9, 10).

Kultuuris pidamise meetodid

Rabeliimuka kasvatustingimused on üksikasjalikult esitatud järgmistes publikatsioonides: Phipps *et al*. (1993) (10), Brunson *et al*. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Lühike kokkuvõte neist on esitatud allpool.

Usse saab kasvatada suures akvaariumis (57–80 l) 23 °C juures, valgustusperiood 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust (valgustatus 100–1 000 luksi), kasutades iga päev vahetatavat looduslikku vett (45–50 liitrit akvaariumi kohta). Substraat valmistatakse pleegitamata pruunide paberrätikute lõikamisega ribadeks, mida võib seejärel mõne sekundi jooksul segada kultuuris kasutatava veega, et saada väiksed pabersubstraadi tükid. Seda substraati saab otse kasutada rabeliimuka kasvatamise akvaariumis, kui laotada see nõu põhjale, või seda võib säilitada külmutatult deioniseeritud vees hilisemaks kasutamiseks. Uus substraat peab kasvatamisnõus tavaliselt vastu ligikaudu kaks kuud.

Iga ussikultuuri alustatakse 500–1 000 ussiga; söödaks antakse neile 3 korda nädalas 10 ml suspensiooni, mis sisaldab 6 g forelli startersööta; kasutada võib nii uuendatavat kasvukeskkonda kui ka läbivoolukatse tingimusi. Staatilises või poolstaatilises kultuuris tuleb söötmist vähendada, et vältida bakterite või seente kasvu. Sööta ja pabersubstraati tuleks analüüsida ainete suhtes, mida uuritakse bioakumulatsiooni katses.

Sellistel tingimustel kahekordistub isendite arv kultuuris üldiselt ligikaudu 10–14 päevaga.

Rabeliimukat võib kasvatamisnõust välja võtta näiteks substraadi eemaldamisega, kasutades peenesilmalist võrku, või usside väljavõtmisega, kasutades tulel poleeritud laiasuulist (läbimõõt umbes 5 mm) klaaspipetti, et tõsta neid eraldi keeduklaasi. Kui koos ussidega satub sellesse keeduklaasi ka substraati, jäetakse keeduklaas usside ja substraadiga üheks ööks läbivoolu alla; vesi kannab substraadi

▼M6

minema ja ussid jäävad nõu põhjale. Seejärel saab ussid üle viia värskelt ettevalmistatud kasvatusnõusse või kasutada neid katse alustamiseks, nagu on kirjeldatud publikatsioonides (1) ja (6). Usside vigastamist või eneseköndistamist tuleks vältida, selleks tuleb nende usside käsitsemiseks kasutada tulel poleeritud otsaga pipette või roostevabast terasest pintsette.

Küsimus, mida tuleb kriitiliselt hinnata rabeliimuka kasutamisel sette bioakumulatsiooni katsetes, on tema paljunemisviis (arhitoomia (jagunemine kaheks fragmendiks), millele järgneb morfallaksis (puuduvate fragmentide moodustamine)). Sellisel mittesugulisel paljunemisel saadakse kaks fragmenti, kes teatava aja jooksul ei toitu, kuni on regenereerinud pea- või sabaosa (näiteks (36, 37)). See tähendab, et sette neelamine ja saasteaine omastamine rabeliimuka poolt võib mitte toimuda pidevalt nagu mudatuplastel, kes ei paljune fragmenteerumisega.

Seepärast tuleks kultuuri sünkroniseerida, et vähendada kontrollimatut paljunemist ja regenereerumist ning selle tõttu katse tulemuste suurt varieeruvust. Selline varieeruvus võib tekkida sellest, kui mõned isendid, kes on jagunenud ja seepärast ei söö teatava ajavahemiku vältel, puutuvad uuritava ainega vähem kokku kui muud isendid, kes katse ajal ei jagune (38). 10–14 päeva enne ainega kokkupuute algust tuleks ussid kunstlikult fragmenteerida (sünkroniseerimine) (65). Tuleks kasutada suuri usse, kellel eelistatavalt ei ole näha hiljutise jagunemise märke. Sellised ussid võib panna objektiklaasile kultuuris kasutatava vee tilga sisse ja lõigata skalpelliga keha keskosas pooleks. Tuleks hoolitseda selle eest, et tagumised otsad oleksid sarnase suurusega. Tagumised otsad tuleks seejärel kuni ainega kokkupuute alguseni jätta regenereerima uusi päid kasvatusnõus, mis sisaldab sama substraati, mida kasutatakse kasvatamisel, ja taastatud vett. Uute, regenereerunud peade olemasolu näitab see, kui sünkroniseeritud ussid kaevuvad substraadisse (regenereerunud pea olemasolu võib tõendada sellega, kui esindavat usside osaproovi vaadeldakse binokulaarmikroskoobiga). Katseorganismid peaksid seejärel olema sarnases füsioloogiaseisundis. See tähendab, et kui sünkroniseeritud ussides toimub katse ajal morfallaksise kaudu regenereerimine, peaksid praktiliselt kõik loomad olema ühtmoodi kokkupuutes rikastatud settega. Sünkroniseeritud usse tuleks sööta kohe, kui ussid hakkavad substraadisse kaevuma, või 7 päeva pärast fragmenteerimist. Söötmisrežiim peaks olema võrreldav tavapärase kultuuri söötmisega, kuid sünkroniseeritud usse võib olla soovitatav sööta samast söödaallikast, mida kasutatakse katse ajal. Usse tuleks hoida katse temperatuuril 20 ± 2 °C juures. Pärast regenereerumist tuleks katses kasutamiseks valida terved tervikliku kehaga ussid, kes väikse mehaanilise ärrituse peale hakkavad aktiivselt ujuma või roomama. Usside vigastamist või eneseköndistamist tuleks vältida, selleks tuleb nende usside käsitsemiseks kasutada tulel poleeritud otsaga pipette või roostevabast terasest pintsette.

Kui katses kasutatakse rabeliimukat, peaks seoses selle liigi erilise paljunemisviisiga usside arv katse jooksul suurenema, kui tingimused on sobivad (6). Kui rabeliimukaga tehtava bioakumulatsiooni katse ajal paljunemist ei toimu, tuleks see registreerida ja seda tuleks arvestada katse tulemuste tõlgendamisel.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), *Tubificidae*, *Oligochaeta* (ringkatsega kinnitamata)**

Branchiura sowerbyi elutseb mitmesuguse settetüübiga veekogudes – jõgedes, järvedes, tiikides, algselt troopilistel aladel. Neid võib leida ka põhjapoolkera sooja veega veekogudes. Siiski on neid sagedamini mudastes-savistes setetes, mille orgaanilise aine sisaldus on suur. Lisaks elavad need ussid settekihi sees. Isegi usside tagaosa on tavaliselt sisse kaevunud. Kõnealune liik on hästi

▼M6

määratav lõpusekiudude järgi nende tagaosas. Täiskasvanud ussid võivad saavutada pikkuse 9–11 cm ja märgkaalu 40–50 mg. Usside paljunemiskiirus on suur, isendite arv kahekordistub vähem kui kahe nädalaga allpool kirjeldatud temperatuuri- ja söötmistingimustes (Aston *et al*., 1982, (65)). *B. sowerbyi*'t on kasutatud nii toksilisuse kui ka bioakumulatsiooni uuringutes (vastavalt Marchese ja Brinkhurst 1996, (31), Roghair *et al*. 1996, (67)).

Kultuuris pidamise meetodid

Allpool on esitatud kokkuvõte *Branchiura sowerbyi*' kultuuris pidamise tingimustest (esitanud Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, ja Carla J. Roghair, RIVM, Madalmaad).

Usside kultuuris pidamiseks ei ole vaja järgida üht kindlat meetodit. Usside kasvatamiseks võib kasutada saastamata looduslikku setet (31). Praktilised kogemused on näidanud, et keskkond, mis koosneb looduslikust settest ja liivast, sobib ussidele paremini kui puhas looduslik sete (32, 67). Kultuuri jaoks sobivad 3 l keeduklaasid, mis sisaldavad 1 500 ml sette ja vee süsteemi, milles on 375 ml saastamata looduslikku setet (orgaanilise süsiniku üldsisaldus ligikaudu 10 %; ligikaudu 17 % osakesi suurusega ≤ 63 μm), 375 ml puhast liiva (M32) ja 750 ml taastatud või deklooritud kraanivett (31, 32, 67). Substraadina võib kasutada ka paberrätikuid, kuid selles kasvab usside arv aeglasemalt kui looduslikus settes. Poolstaatilistes süsteemides aereeritakse keeduklaasis olevat katvat veekihti aeglaselt ja kord nädalas tuleks veekihti uuendada.

Igasse keeduklaasi pannakse alustuseks 25 noort ussi. Kahe kuu pärast nopitakse suured ussid settest pintsettidega välja ja viiakse üle uude keeduklaasi, milles on värskelt valmistatud sette-vee kasvukeskkond. Vana keeduklaas sisaldab ka kookoneid ja usside noorjärke. Sellisel viisil saab igast keeduklaasist koguda kuni 400 noort ussi. Täiskasvanud usse saab paljundamiseks kasutada vähemalt üks aasta.

Kasvukultuure tuleks hoida temperatuuril 21–25 °C. Temperatuuri muutumised tuleks hoida alla 2 °C. Aeg, mis kulub embrüonaalseks arenguks, alates munetud munast kuni noore ussi väljumiseni kookonist, on temperatuuril 25 °C umbes kolm nädalat. Munasaagis ühe elusa ussi kohta *B. sowerbyi*' kultuuris oli mudas temperatuuril 25 °C alates 6,36st (31) kuni 11,2ni (30). Munade arv kookonis on vahemikus 1,8–2,8 (66, 69) või kuni 8 (68).

Iga nädal tuleks mõõta lahustunud hapniku kontsentratsiooni, vee karedust, temperatuuri ja pH-d. Kalasööta (nt TetraMin®) võib lisada suspensioonina kaks või kolm korda nädalas *ad libitum*. Usse võib sööta ka ülessulatatud aedsalatiga *ad libitum*.

Selle liigi üks peamisi suuri eeliseid on isendi suur biomass (isendi märgmass on 40–50 mg). Seepärast saab seda liiki kasutada radioaktiivse märgiseta uuritava aine bioakumulatsiooni katsetes. Selle liigi puhul võib mudatupe või rabeliimuka puhul kasutatud süsteemides viia uuritava ainega kokkupuutesse üheainsa isendi paralleelkatse kohta (11). Paralleelkatseid tuleb siiski teha rohkem, kui ei kasutata suuremaid katsekambreid (11). Ka usside kaevumiskäitumisega seotud katse nõuetekohasuse kriteeriumi tuleb selle liigi puhul muuta.

▼**M6**

KIRJANDUS

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) Käesoleva lisa peatükk C.13. Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) Käesoleva lisa peatükk C.27. Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud sette kasutamisega.

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼**M6**

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Käesoleva lisa järgmised peatükid:

Peatükk A.4. Aururõhk.

Peatükk A.5. Pindpinevus.

Peatükk A.6. Lahustuvus vees.

Peatükk A.8. Jaotustegur. Loksutamismeetod.

Peatükk A.24 Jaotuskoefitsient, HPLC meetod.

Peatükk C.7. Lagunemine – abiootiline lagunemine: hüdrolüüsi sõltuvus pHst.

Käesoleva lisa peatükk C.4 A–F. Kohese biolagunduvuse määramine.

Käesoleva lisa peatükk C.19. Adsorptsiooniteguri (K_{OC}) kindlaksmääramine mullas ja reoveesettes kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil.

Käesoleva lisa peatükk C.29. Kiire biolagundatavus – CO_2 suletud nõudes (vabaruumi katse).

(23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼M6

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

(31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

(32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Käesoleva lisa peatükk C.1. Äge mürgisus kaladele.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

▼**M6**

(40) Käesoleva lisa peatükk C.8, Toksilisus vihmaussidele – tehismulla test.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897-1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

C.47. VARASES ARENGUJÄRGUS KALADELE AVALDUVA MÜRGISUSE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 210 (2013). Varases arengujärgus kaladega tehtavad katsed on ette nähtud kemikaalide surmava ja subletaalse mõju kindlakstegemiseks katses kasutatavate liikide eri arengujärgus kaladele. Nendest saadakse väärtuslikku teavet asjaomase kemikaali kroonilise, surmava ja subletaalse mõju hindamiseks ka muude kalaliikide puhul.

2. Katsejuhend nr 210 põhineb Ühendkuningriigi ettepanekul, mida arutati OECD ekspertide kohtumisel 1988. aasta novembris Medmenhamis (Ühendkuningriik) ja ajakohastati 2013. aastal, et võtta arvesse katse kasutuselevõtmisega saadud kogemusi ja kaladele avalduva mürgisuse katset käsitleval, 2010. aasta septembris toimunud OECD seminaril koostatud soovitusi (1).

KATSE PÕHIMÕTE

3. Varases arengujärgus kalad viiakse kokkupuutesse eri kontsentratsioonides esineva vees lahustunud uuritava kemikaaliga. Soovitatakse kasutada läbivoolutingimusi, ent kui see ei ole võimalik, on vastuvõetavad ka poolstaatilised tingimused. Sellekohaseid üksikasju tuleks vaadata OECD juhenddokumendist raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta (2). Katse alustamiseks pannakse viljastatud marjaterad katsekambrisse ja katset jätkatakse liigist sõltuva pikkusega ajavahemiku vältel, mis on vajalik kontrollrühma kalade jõudmiseks noorjärku. Surmavat ja subletaalset mõju võrreldakse kontrollrühma väärtustega, et teha kindlaks vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ning: i) täheldatava toime puudumise kontsentratsioon ja/või ii) EC_x (nt EC_{10}, EC_{20}); viimasel juhul kasutatakse regressioonimudelit sellise hinnangulise kontsentratsiooni leidmiseks, mille puhul mõõdetav näitaja muutub x % võrra. Konkreetsetest toime avaldumise kontsentratsioonidest ja näitajatest aru andmine võib sõltuda asjaomasest õigusraamistikust. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x väärtust, nii et EC_x leitakse interpoleerimise, mitte ekstrapoleerimise teel (mõisted on määratletud 1. liites).

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

4. Uuritava kemikaali all peetakse silmas katses kasutatavat kemikaali. On vaja teada uuritava kemikaali lahustuvust vees (vt käesoleva lisa peatükk A.6) ja aururõhku (vt käesoleva lisa peatükk A.4) ning kemikaali sisalduse määramiseks katselahuses peaks olemas olema usaldusväärne analüüsimeetod, mille täpsus ja määramispiir on teada ja avaldatud. Ehkki need ei ole katse läbiviimiseks vajalikud, võivad kasulikku teavet pakkuda tulemused, mis on saadud ägeda mürgisuse hindamise katsest (vt käesoleva lisa peatükk C.1 või C.49) – soovitatavalt sellisest, kus on kasutatud siin kirjeldatud katse jaoks valitud liike.

5. Kui käesolevat katsemeetodit kasutatakse segu analüüsimiseks, peaks selline segu olema võimalikult hästi iseloomustatud, näiteks selle koostisainete keemilise määratluse, kvantitatiivse sisalduse ja iga koostisaine omaduste (näiteks eespool nimetatud omaduste) suhtes. Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks regulatiivsel eesmärgil tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused.

6. Asjakohane kasulik teave hõlmab aine struktuurivalemit, puhtust, lahustuvust vees, püsivust vees ja valguse käes, pK_a-d, P_{ow}-d ning kiire biolagundatavuse katse tulemusi (nt käesoleva lisa peatükk C.4 või C.29).

▼M7

KATSE NÕUETEKOHASUS

7. Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised tingimused:

— lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu katse vältel olema suurem kui 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist;

— vee temperatuur ei tohiks kogu katse vältel eri katsekambrites ja järjestikustel päevadel erineda rohkem kui ± 1,5 °C ning see tuleks hoida katsealuse liigi jaoks ette nähtud temperatuurivahemikus (2. liide);

— katsekontsentratsioonide analüütiline mõõtmine on kohustuslik;

— viljastatud marjaterade üldine elulemus ja koorumisjärgne edukus kontrollrühmas ja vajaduse korral ka lahustiga kontrollrühmas ei tohiks olla väiksem kui 2. liites määratletud alampiir.

8. Kui leitakse väikseid kõrvalekaldeid katse nõuetekohasuse kriteeriumidest, tuleks kaaluda selliste kõrvalekallete mõju katseandmete usaldusväärsusele ja esitada need kaalutlused katseprotokollis. Katseandmete usaldusväärsuse kontekstis tuleks välja tuua lahustiga kontrollrühmas täheldatav mõju elulemusele, koorumisele ja kasvule, võrreldуna negatiivse kontrolliga, ning sellise mõju üle arutleda.

MEETODI KIRJELDUS

Katsekambrid

9. Võib kasutada ükskõik milliseid klaasist, roostevabast terasest või muust keemiliselt inertsest materjalist nõusid. Kuna on teada, et silikoon on võimeline tugevalt absorbeerima lipofiilseid aineid, tuleks kasutada läbivoolukatsetes võimalikult vähe silikoonvoolikuid ja minimeerida veega kokku puutuvate silikoontihendite kasutamist, näiteks liitekohtadeta klaasakvaariumi kasutamisega. Nõude mõõtmed peaksid olema piisavalt suured, et oleks tagatud nõuetekohane kasv kontrollrühmas, lahustunud hapniku sisalduse säilimine (nt väikese kalaliigi puhul piisab nõust mahuga 7 l) ja punktis 19 esitatud biomassisisalduse kriteeriumide järgimine. Katsekambrid soovitatakse paigutada katse läbiviimise alal juhuslikult. Eelistatav on selline plokkide randomiseeritud paigutus, kus igas plokis on esindatud iga kontsentratsioon; see on parem kui täielikult randomiseeritud paigutus. Katsekambrid peaksid olema kaitstud soovimatu häirimise eest. Katsesüsteemil on soovitatav enne katseorganismide sisseviimist lasta uuritava kemikaaliga eri kontsentratsioonidel piisavalt kohaneda, et veenduda kokkupuutekontsentratsioonide püsivuses.

Liigi valimine

10. Soovitatavad kalaliigid on esitatud tabelis 1. Võib kasutada ka muid liike, kuid selleks võib olla vaja kohandada katsekorda, et luua sobivad katsetingimused. Sellisel juhul tuleb liigi ja katsemeetodi valikut põhjendada.

Sugukalade pidamine

11. Sugukarja kalade rahuldavates tingimustes pidamise üksikasjad on esitatud 3. liites ja viidetes 3–5.

Viljastatud marja, embrüote ja vastsete hoidmine

12. Esialgu võib viljastatud marja, embrüoid ja vastseid hoida põhinõu sees väiksemates klaasist või roostevabast terasest nõudes, mille küljed või otsad on kaetud võrguga, et katselahus saaks nõust läbi voolata. Keeristeta voolu tekitamiseks läbi nende väikeste nõude võib riputada nõud hoova

▼M7

külge, mis võimaldab neid üles ja alla liigutada, kuid hoiab organismid kogu aeg lahuses. Lõhelaste viljastatud marjaterad võib asetada raamile või võrgule, mille avad on piisavalt suured, et vastsed pärast koorumist sealt läbi mahuksid.

13. Kui katse põhinõus kasutatakse marjaterade hoidmiseks marjaterade anumaid, reste või võrke, tuleks need 3. liites esitatud juhendi kohaselt pärast vastsete koorumist eemaldada, välja arvatud vastsete põgenemist takistavad võrgud. Kui vastseid on vaja ümber paigutada, ei tohiks lasta neil õhuga kokku puutuda ega kasutada võrke vastsete väljatõstmiseks marjaterade anumast. Ümberpaigutamise aeg varieerub liigiti ja see tuleks märkida katseprotokolli. Ümberpaigutamine ei pruugi alati olla vajalik.

Vesi

14. Katses võib kasutada sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga (vt 4. liide). Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Selle tagamiseks, et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi ega põhjustaks näiteks uuritava kemikaaliga komplekside moodustumist või avaldaks negatiivset mõju sugukarja jõudlusele, tuleks kindlate ajavahemike järel võtta analüüsimiseks veeproove. Kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskmetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) ning ammoniaagi sisaldus, kloori sisaldavate pestitsiidijääkide üldsisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks kaks korda aastas. Kui vesi on teadaolevalt varieeruva kvaliteediga, tuleb mõõtmisi teha sagedamini; nende sagedus sõltub kvaliteedi varieerumise ulatusest. Nõuetekohase lahjendusvee mõned keemilised omadused on loetletud 4. liites.

Katselahused

15. Läbivoolukatsete puhul tuleb kasutada süsteemi, kus uuritava kemikaali põhilahust lisatakse ja lahjendatakse pidevalt (nt dosaatorpump, proportsionaalse lahjendamise seade, küllastusseade), et saavutada katsekambrites rida eri kontsentratsioone. Põhilahuste ja lahjendusvee voolukiirust tuleks katse jooksul kindlate ajavahemike järel kontrollida ja see ei tohiks kogu katse vältel varieeruda rohkem kui 10 %. Sobivaks peetakse voolukiirust, millega tagatakse 24 tunni jooksul lahuse vahetumine vähemalt viiekordses katsekambri mahus (3). Punktis 19 sätestatud asutustiheduse järgimise korral võib sööda kiire kõrvaldamise ärahoidmiseks siiski kasutada väiksemat voolukiirust, mille puhul lahus vahetub näiteks kahe- või kolmekordses katsekambri mahus.

16. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahjendusvees mehaanilisel teel (nt segamine ja/või ultrahelitöötlus) soovitatavalt lihtsalt segada või loksutada. Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne) või passiivse doseerimise meetodeid (6). Lahusti kasutamine ei ole soovitatav. Kui lahusti on siiski vajalik, tuleks katses paralleelselt kasutada lahustiga kontrollrühma, mille puhul lahusti kontsentratsioon on sama kui uuritava kemikaaliga rühmades, st lahusti sisaldus peaks soovitatavalt olema kemikaali iga kontsentratsiooni ja lahustiga kontrollrühma puhul sama. Mõnes lahjendussüsteemis võib seda olla tehniliselt raske saavutada; sellisel juhul peaks lahusti sisaldus lahustiga kontrollrühmas olema võrdne lahusti suurima sisaldusega

▼M7

uuritava kemikaaliga rühmades. Raskesti uuritavate ainete puhul tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga nr 23 raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta (2). Lahusti kasutamisel määravad lahusti valiku aine keemilised omadused. OECD juhenddokumendi nr 23 kohaselt on suurim soovitatav lahusti kontsentratsioon 100 µl/l. Et hoida ära lahusti võimalikku mõju mõõdetavatele lõppnäitajatele (7), soovitatakse kasutada võimalikult madalat lahusti kontsentratsiooni.

17. Poolstaatilise katse puhul võib järgida kahte eri uuendamismeetodit. Puhastesse nõudesse võib valmistada uued katselahused ning allesjäänud marjaterad ja vastsed ettevaatlikult uutesse nõudesse üle viia; teise võimalusena jäetakse katseorganismid samasse katsekambrisse ja uuendatakse osa (vähemalt kaks kolmandikku) katselahusest/kontroll-lahusest.

KATSE KÄIK

Kokkupuutetingimused

Kestus

18. Katset tuleks alustada võimalikult kiiresti pärast marjaterade viljastamist ning viia marjaterad katselahusesse soovitatavalt enne blastodiski lõigustumise algust või võimalikult kiiresti pärast seda. Katse kestus sõltub kasutatavast liigist. Mõnel puhul soovitatav kestus on esitatud 2. liites.

Biomassisisaldus

19. Viljastatud marjaterade arv katse alguses peaks olema statistikanõuetele vastavuse tagamiseks piisav. Marjaterad tuleks jagada katserühmadesse juhuslikkuse alusel ning iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada vähemalt 80 marjatera, mis jagatakse võrdselt vähemalt nelja paralleelse katsekambri vahel. Biomassisisaldus (biomass katselahuse ruumalaühiku kohta) peaks olema piisavalt väike, et marjaterade ja vastsete staadiumis püsiks lahustunud hapniku sisaldus aereerimiseta tasemel vähemalt 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist. Läbivoolukatsete puhul soovitatakse biomassisisaldust, mille puhul märgmass ei ole 24 tunni ja liitri lahuse kohta suurem kui 0,5 g ega ühelgi hetkel suurem kui 5 g/l (3).

Valgus ja temperatuur

20. Valgustusperiood ja veetemperatuur peaksid olema katseliigile sobivad (vt 2. liide).

Söötmine

21. Sööt ja söötmine on otsustava tähtsusega ning on oluline, et igal arenguetapil antaks sobivast ajast alates normaalse kasvu tagamiseks piisavas koguses õiget sööta. Sööda kogus peaks olema paralleelrühmades enam-vähem võrdne, kui seda ei kohandata suremuse suhtes. Sööda ülejäägid ja väljaheited tuleks vastavalt vajadusele eemaldada, et hoida ära jäätmete kogunemist. Üksikasjalikud söötmisrežiimid on esitatud 3. liites, ent sööda ja söötmisrežiimide üksikasju täpsustatakse kogemuste varal pidevalt, et elulemust suurendada ja kasvu optimeerida. Elussööt rikastab keskkonda ja seepärast tuleks seda sobiva liigi ja arengujärgu puhul alati kasutada kuivsööda ja külmutatud sööda asemel või nende täiendamiseks.

Uuritava kemikaali kontsentratsioonid

22. Tavaliselt on vaja kasutada uuritavat kemikaali viiel kontsentratsioonil, mille jada konstantne tegur ei ole suurem kui 3,2, ning igal kontsentratsioonil vähemalt nelja paralleeli. Katsekontsentratsioonide vahemiku valimisel tuleks võimaluse korral arvesse võtta soovitatavalt sama liigiga läbi viidud ägeda mürgisuse hindamise katse ja/või kontsentratsioonivahemiku leidmise katse andmeid (1). Kontsentratsioonivahemiku valimisel tuleks siiski kaaluda kõikidest allikatest pärit teavet, sealhulgas näiteks kalaembrüotele avalduva ägeda mürgisuse hindamise katse ülekantavaid tulemusi. Kui nõutakse üksnes täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni empiirilist määramist,

▼M7

võib lõpliku katsena olla vastuvõetav piirsisalduskatse või laiendatud piirsisalduskatse, kus kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleks seda põhjendada. Uuritavat kemikaali ei ole vaja kasutada kontsentratsioonis, mis on suurem kui 96 tunni puhul täheldatav LC_{50} või 10 mg/l, olenevalt sellest, kumb on väiksem.

Kontrollid

23. Lisaks uuritava kemikaali kontsentratsioonide jadale tuleks kasutada paralleelselt ka lahjendusveega kontrolli ja vajaduse korral lahustiga kontrolli, mis sisaldab üksnes lahustit (vt punkt 16).

Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus

24. Enne kokkupuuteperioodi algust tuleks tagada kemikaali lisamise süsteemi nõuetekohane toimimine kõikides paralleelides (näiteks katsekontsentratsioonide mõõtmise teel). Tuleks kindlaks teha nõutavad analüüsimeetodid, sealhulgas asjakohane määramispiir ja piisav teave aine püsivuse kohta katsesüsteemis. Kokkupuute kirjeldamiseks määratakse katse vältel uuritava kemikaali kontsentratsioonid korrapäraste ajavahemike järel. Tehakse vähemalt viis määramist. Läbivoolusüsteemis tuleks uuritavat kemikaali analüütiliselt määrata vähemalt kord nädalas ühes paralleelrühmas iga kontsentratsiooni kohta ning vahetada paralleele süstemaatiliselt. Täiendavad analüütilised määramised parandavad sageli katsetulemuste kvaliteeti. Proovid võib olla vaja tahkete osakeste kõrvaldamiseks filtrida (nt läbi filtri, mille pooride läbimõõt on 0,45 μm) või tsentrifuugida, et veenduda, et kemikaali määramine toimub tõelises lahuses. Uuritava kemikaali adsorbeerumise vähendamiseks tuleks filter enne kasutamist küllastada. Kui mõõdetud kontsentratsioon ei ole vahemikus 80–120 % nominaalväärtusest, tuleks toime avaldumise kontsentratsioonide määramisel ja väljendamisel võtta läbivoolukatse puhul aluseks mõõdetud kontsentratsioonide aritmeetiline keskmine (aritmeetilise keskmise arvutamist on kirjeldatud katsemeetodi C.20 (8) 6. liites) ja poolstaatilise katse puhul kontsentratsioonide geomeetriline keskmine (vt raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimist käsitlev OECD juhenddokument (2), 5. peatükk).

25. Katse vältel tuleks kõikides katsenõudes mõõta vähemalt kord nädalas lahustunud hapniku sisaldus, pH ja temperatuur ning vajaduse korral katse alguses ja lõpus soolsus ja karedus. Temperatuuri tuleks soovitatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katsenõus.

Vaatlused

26. **Embrüonaalse arengu staadium**: embrüonaalse arengu staadium uuritava kemikaaliga kokkupuute alguses tuleks teha kindlaks nii täpselt kui võimalik. Selleks võib kasutada sobivalt säilitatud ja puhastatud representatiivset marjaterade proovi.

27. **Koorumine ja ellujäämine**: koorumise ja ellujäämise vaatlust tuleks teha vähemalt kord päevas ja tulemused üles märkida. Kui varase embrüonaalse arengu ajal (nt esimesel või teisel katsepäeval) täheldatakse marjaterade pinnal seente kasvu, tuleks sellised marjaterad loendada ja eemaldada. Surnud embrüod, vastsed ja noorkalad tuleks eemaldada kohe, kui neid märgatakse, kuna need võivad kiiresti laguneda ja teised kalad võivad need tükkideks kiskuda. Surnud organismide eemaldamisel tuleks olla väga tähelepanelik, et kõrvalolevaid marjateri/vastseid füüsiliselt mitte kahjustada. Surmale viitavad märgid varieeruvad sõltuvalt liigist ja arenguetapist. Näited:

▼M7

— viljastatud marjaterad: eelkõige varastes etappides märkimisväärne läbipaistvuse kadu ja värvuse muutus, mis on põhjustatud valkude koaguleerumisest ja/või sadenemisest ja mille tulemusena marjaterad muutuvad valgeks ja läbipaistmatuks;

— embrüod, vastsed ja noorkalad: liikumatus ja/või hingamisliigutuste puudumine ja/või südamelöökide puudumine ja/või võimetus reageerida mehaanilisele ärritusele.

28. **Kõrvalekalded välimuses**: ebanormaalse kehakujuga vastsete ja noorkalade arv tuleks registreerida piisava sagedusega, olenevalt katse kestusest ja kirjeldatavast kõrvalekaldest. Tuleks silmas pidada, et kõrvalekaldega vastseid ja noorkalu esineb looduslikult ning nende osakaal võib mõnel liigil olla kontrollrühma(de)s mitu protsenti. Kui väärarengut ja sellega seotud ebanormaalset käitumist peetakse nii tõsiseks, et see põhjustab asjaomasele organismile märkimisväärseid kannatusi ja organism ei ole võimeline sellisest seisundist enam taastuma, võib sellise organismi katsest kõrvaldada. Asjaomase looma puhul tuleks rakendada halastussurma ja seda tuleks hilisemal andmeanalüüsil käsitleda osana suremusest. Käesoleva katsemeetodi puhul soovitatavatest liikidest enamiku puhul on tavapärane embrüonaalne areng dokumenteeritud (9–12).

29. **Kõrvalekalded käitumises**: käitumuslikud kõrvalekalded, näiteks hüperventileerimine, koordineerimatus ujumisel, ebatüüpiline loidus või ebaharilik toitumine tuleks katse kestusest olenevalt registreerida piisava sagedusega (nt soojaveekalade puhul kord päevas). Ehkki sellist mõju on raske kvantifitseerida, võivad kõnealused tähelepanekud aidata tõlgendada suremuse andmeid.

30. **Kehamass**: katse lõpus kaalutakse kõik ellujäänud kalad vähemalt paralleelrühma tasandil (registreeritakse kalade arv paralleelrühmas ja nende keskmine mass): soovitatavalt leitakse märgmass (kalad kuivatatakse kuivatuspaberiga), ent võib registreerida ka kuivmassi (13).

31. **Pikkus**: katse lõpus mõõdetakse iga kala pikkus. Soovitatavalt mõõdetakse üldpikkus, kuid sabauime mädaniku või uimede erosiooni korral võib mõõta ka standardpikkuse. Kõikide ühes katses kasutatavate kalade puhul tuleks rakendada sama meetodit. Iga kala pikkuse võib mõõta näiteks nihiku, digitaalse fotoaparaadi või kaliibritud okulaarmikromeetri abil. Tüüpilised miinimumpikkused on määratletud 2. liites.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete töötlemine

32. Katseplaan ja valitud statistiline test peaksid soovitatavalt tagama piisava usaldusväärsuse (vähemalt 80 %), et võimaldada tuvastada bioloogiliselt olulisi lõppnäitaja muutusi katses, mille puhul tuleb esitada täheldatava toime puudumise kontsentratsioon. Konkreetsetest toime avaldumise kontsentratsioonidest aru andmine võib sõltuda asjaomasest õigusraamistikust. EC_x esitamise vajaduse korral peaks katseplaan ja valitud regressioonimudel võimaldama hinnata EC_x väärtust nii, et i) EC_x puhul leitud usaldusvahemik usaldusnivool 95 % ei hõlma nulli ega ole ülemäära lai, ii) EC_x-le vastava hinnangulise keskväärtuse usaldusvahemik usaldusnivool 95 % ei hõlma kontrollrühma keskväärtust ning iii) ei esine märkimisväärset lahknevust regressioonimudeli ja andmete vahel. Kummagi lähenemisviisi puhul on vaja teha kindlaks iga olulise tuvastatava või hinnatava lõppnäitaja protsentuaalne muutus. Katseplaani tuleks sellest lähtuvalt kohandada. Kui eespool esitatud tingimused EC_x määramiseks ei ole täidetud, tuleks kasutada lähenemisviisi, mille puhul määratakse täheldatava toime puudumise kontsentratsioon. On vähetõenäoline, et kõikide lõppnäitajate puhul täheldatakse sama

▼M7

protsentuaalset muutust ning et on võimalik koostada selline katseplaan, kus kõnealused kriteeriumid on täidetud kõikide lõppnäitajate puhul; seepärast on tähtis keskenduda nõuetekohase katse kavandamisel lõppnäitajatele, mis on asjaomase katse puhul olulised. Statistilised vooskeemid ja juhendid kummagi lähenemisviisi jaoks on esitatud 5. ja 6. liites, et pakkuda juhiseid andmete töötlemiseks ja sobivaima statistilise testi või mudeli valimiseks. Võib kasutada ka muid statistilisi lähenemisviise, kui need on teaduslikult põhjendatud.

33. Igas paralleelide rühmas on vaja analüüsida varieeruvust dispersioonanalüüsi või sagedustabeli abil ning kasutada selle analüüsi alusel valitud asjakohaseid statistilisi analüüsimeetodeid. Igal eraldi kontsentratsioonil ja kontrollrühmas saadud tulemuste mitmeseks võrdlemiseks soovitatakse pideva tunnuse puhul kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra või Williamsi testi ning binaarse tunnuse puhul, millel täheldatakse monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust ja mille puhul ei esine binoomjaotuse ülehajuvust, muutujate sammuviisilise elimineerimisega Cochrani-Armitage'i testi (14). Binoomjaotuse ülehajuvuse korral soovitatakse kasutada Cochrani-Armitage'i testi Rao-Scotti modifikatsiooni (15, 16) või Williamsi või Dunnetti (nurkteisenduse järgselt) või Jonckheere'i-Terpstra testi paralleelide osakaalude suhtes. Kui andmed ei väljenda monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust, võib pideva tunnuse puhul olla kasu Dunnetti, Dunni või Manni-Whitney meetodist ning binaarse tunnuse puhul Fisheri-Yatesi testist (14, 17, 18). Iga statistilise meetodi või mudeli kohaldamisel tuleks olla ettevaatlik ja veenduda, et asjaomasest meetodist või mudelist tulenevad nõuded on täidetud (nt kasutatava katseplaani ja testi või mudeli puhul on hinnatud ja arvesse võetud kambritevahelist varieeruvust). Andmeid hinnatakse normaaljaotuse suhtes ja 5. liites on kirjeldatud, mida tuleks teha dispersioonanalüüsil saadud hälvetega. Regressioonanalüüsiga seotud lisakaalutlused on esitatud 6. liites. Asjakohase statistilise testi nõuetele vastavuse saavutamiseks tuleks kaaluda teisendamist. Regressioonimudeli kohandamist võimaldaval teisendamisel tuleb siiski olla väga hoolikas, kuna näiteks 25 % suurune muutus teisendamata andmete puhul ei vasta 25 % suurusele muutusele teisendatud andmete puhul. Iga analüüsi puhul on analüüsitav üksus ja katseüksus katsekamber, mitte üksikud kalad, ning see peaks kajastuma nii hüpoteesi kontrollimise testides kui ka regressioonanalüüsis (3, 14, 19, 20).

Katseprotokoll

34. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus, nt koostisosade keemiline määratlus (vt eespool), kvantitatiivne sisaldus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused.

Katsealune liik:

— teaduslik nimetus, liin, päritolu ning viljastatud marjaterade kogumise ja järgneva käitlemise meetod.

▼M7

Katsetingimused:

— kasutatud katserežiim (nt poolstaatiline või läbivoolurežiim, biomassisisaldus);

— valgustusperiood(id);

— katseplaan (nt katsekambrite ja paralleelrühmade arv, marjaterade arv paralleelrühma kohta, katsekambri materjal ja suurus (kõrgus, laius, ruumala), vee kogus katsekambri kohta);

— põhilahuste valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada selle sisaldus);

— uuritava kemikaali annustamismeetod (nt pump, lahjendussüsteem);

— meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja nominaalsed katsekontsentratsioonid, määramispiir, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja standardhälbed ja nende arvutamise meetod ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali sisaldust tõelises lahuses;

— lahjendusvee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, kloorijääkide sisaldus (kui on mõõdetud), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (kui on mõõdetud), hõljuvaine sisaldus (kui on mõõdetud), katselahuse soolsus (kui on mõõdetud) ja kõik muud mõõdetud näitajad;

— vee kvaliteet katsenõudes: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku sisaldus;

— üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus).

Vastavalt vajadusele iga kala kohta (või paralleelrühma tasandil) ning keskväärtuse ja variatsioonikordajana esitatavad andmed järgmiste lõppnäitajate kohta:

— tõendid selle kohta, et kontrollrühmades vastas elulemus katsealuse liigi puhul üldiselt aktsepteeritavale normile (2. liide);

— andmed suremuse kohta igas staadiumis (embrüo, vastne ja noorkala) ning kumulatiivse suremuse kohta;

— koorumiseni kulunud päevade arv, koorunud vastsete arv igal päeval ja koorumise lõppemise aeg;

— tervete kalade arv katse lõpus;

— ellujäänud kalade pikkuse (täpsustada, kas standardpikkus või üldpikkus) ja massi andmed;

— võimalike morfoloogiliste kõrvalekallete esinemissagedus, kirjeldus ja arv;

— võimalike käitumuslike kõrvalekallete esinemissagedus, kirjeldus ja arv;

— statistilise analüüsi puhul kasutatud lähenemisviis (regressioonanalüüs või dispersioonanalüüs) ja andmetöötlusviis (kasutatud statistiline test või mudel);

— täheldatava toime puudumise kontsentratsioon iga hinnatud näitaja puhul;

▼M7

— vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon (p = 0,05) iga hinnatud näitaja puhul;

— vajaduse korral EC_x iga hinnatud näitaja puhul koos usaldusvahemikuga (nt usaldusnivool 90 % või 95 %) ja graafik selle arvutamiseks kasutatud lähendatud kõveraga, kontsentratsioonist sõltuvuse kõvera tõus, regressioonimudeli võrrand ning mudeli hinnangulised parameetrid ja nende standardviga.

Kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist.

Tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

Tabel 1

Katse jaoks soovitatavad kalaliigid

MAGEVEEKALAD	SUUDMEALA- ja MEREKALAD
Oncorhynchus mykiss Vikerforell	*Cyprinodon variegatus* Hammaskarp
Pimephales promelas Tüse tömpnina	*Menidia* sp. Hõbeateriin
Danio rerio Vöödiline daanio	
Oryzias latipes Jaapani riisikala	

KIRJANDUS

(1) OECD (2012). Fish Toxicity Testing Framework. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 171. OECD, Pariis.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Pariis.

(3) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. USA Materjalide Katsetamise Ühing, E 1241-88. 26 lk.

(4) Brauhn, J. L., ja Schoettger, R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills. Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W. A. ja Jones, B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. Ecological Research Series, EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici *et al*. (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere* 86: 593–599.

(7) Hutchinson, T. H., *et al*. (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquat. Toxicol.* 76: 69–92.

(8) Käesoleva lisa peatükk C.20 „Hiidkiivriku (*Daphnia magna*) sigivuse katse“.

(9) Hansen, D. J., ja Parrish, P. R. (1977). Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests. Väljaandes: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (toim. Mayer, F. L., ja Hamelink, J. L.). ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B., *et al*. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* 203: 253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M., *et al* (2005). A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae). *J. Appl. Ichthyol.* 20: 1–14.

(12) Devlin, E. W., *et al*. (1996). Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USA Keskkonnakaitseamet, teadus- ja arendustegevuse büroo, Washington, D. C.

(13) Oris, J. T., Belanger, S. C., ja Bailer, A. J. (2012). Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2): 370–376.

(14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariis.

(15) Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577–585.

(16) Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Stat. Med.* 18: 1373–1385.

(17) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50: 1096–1121.

(18) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.

(19) Rand, G. M., ja Petrocelli, S. R. (1985). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J. T., Sullivan, J. H., ja Pearson, J. G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

1. liide

MÕISTED

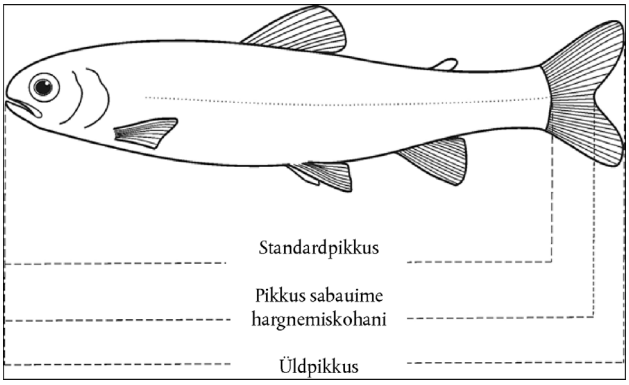
Pikkus sabauime hargnemiskohani – kala pikkus ninamiku tipust kui sabauime keskmiste kiirte otsani; kasutatakse kalade puhul, kelle selgroo lõppemiskohta on keeruline kindlaks teha (www.fishbase.org).

Standardpikkus – kala pikkus ninamiku tipust viimase selgroolüli tagaotsani või hüpuraalplaadi külje keskosa tagaotsani. Lihtsamalt öeldes ei hõlma see pikkus sabauime pikkust (www.fishbase.org).

Üldpikkus – kala pikkus ninamiku tipust sabauime pikema hõlma tipuni; tavaliselt surutakse hõlmad mõõtmiseks keskjoonele kokku. Seda pikkust mõõdetakse sirgjooneliselt, mitte keha kumeruse järgi (www.fishbase.org).

Joonis 1

Kasutatavate eri pikkuste kirjeldus



Kemikaal – aine või segu.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC_{50} on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

Vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon – uuritava kemikaali väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peaks kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist kõrgematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon) on valitud. Sellekohased juhised on esitatud 5. ja 6. liites.

Täheldatava toime puudumise kontsentratsioon – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit).

SMILES – Simplified Molecular Input Line Entry Specification (lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem).

▼M7

2. liide

KATSETINGIMUSED, KATSE KESTUS JA ELULEMUSKRITEERIUMID SOOVITATAVATE LIIKIDE JAOKS

LIIK	KATSETINGIMUSED			SOOVITATAV KATSE KESTUS	Kontrollrühma kalade tavapärane minimaalne keskmine üldpikkus katse lõpus (mm) (1)	ELULEMUS KONTROLLRÜHMAS (minimaalne)	
	Temperatuur (°C)	Soolsus ($^0/_{00}$)	Valgustusperiood (tundides)			Koorumise edukus	Koorumisjärgne elulemus
Mageveekalad							
Oncorhynchus mykiss Vikerforell	10 ± 1,5 (2)		12–16 (3)	2 nädalat alates hetkest, mil kontrollrühma kalad hakkavad vabalt toituma (või koorumisjärgselt 60 päeva)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Tüse tõmpnina	25 ± 1,5		16	32 päeva katse algusest (või koorumisjärgselt 28 päeva)	18	70 %	75 %
Danio rerio Vöödiline daanio	26 ± 1,5		12–16 (4)	Koorumisjärgselt 30 päeva	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Jaapani riisikala	25 ± 2		12–16 (5)	Koorumisjärgselt 30 päeva	17	80 %	80 %
Suudmeala- ja merekalad							
Cyprinodon variegatus Hammaskarp	25 ± 1,5	15–35 (5)	12–16 (4)	32 päeva katse algusest (või koorumisjärgselt 28 päeva)	17	75 %	80 %
***Menidia* sp.** Hõbeateriin	22–25	15–35 (5)	13	28 päeva	20	80 %	60 %

Selgitus

(1) Tavapärast minimaalset keskmist üldpikkust ei käsitata nõuetekohasuse kriteeriumina, kuid esitatud väärtusest väiksema näitaja korral tuleks seda asjaolu katses vaadeldavast tundlikkusest lähtuvalt põhjalikult uurida. Minimaalne keskmine üldpikkus põhineb valikul praegu kättesaadavatest andmetest.

(2) Katses kasutatava konkreetse vikerforelliliini puhul võib olla vaja kasutada muud temperatuuri. Sugukarja tuleb hoida samal temperatuuril kui marja saamiseks kasutatavaid kalu. Pärast marjaterade saamist marja tootvast ettevõttest on vaja kohandada neid saabumise järel lühiajaliselt (nt 1–2 tundi) katsetemperatuuriga.

(3) Vastseid hoitakse koorumisjärgselt nädal aega pimedas, välja arvatud nende kontrollimise ajal, ning seejärel kasutatakse kogu katse vältel vähest valgustust (valgustusperiood 12–16 tundi) (4).

(4) Konkreetsete katsetingimuste puhul peaks valgustusrežiim olema muutumatu.

(5) Seda näitajat järgitakse igas konkreetses katses täpsusega ± 2 $^0/_{00}$.

▼M7

3. liide

SOOVITATAVATE LIIKIDE SUGUKALADE JA KATSEALUSTE ISENDITE SÖÖTMISE JA KÄITLEMISE JUHISED

LIIK	SÖÖT (*)				KOORUMISJÄRGSE ÜLEVIIMISE AEG	ESIMESE SÖÖTMISE AEG
	Sugukalad	Äsja koorunud vastsed	Noorkalad			
			Sööda liik	Sagedus		
Mageveekalad						
Oncorhynchus mykiss Vikerforell	Forellisööt	Puudub (α)	Forelli noorkalade sööt, BSN	2–4 söötmiskorda päevas	14–16 päeva pärast koorumist või pinnale ujumisel (ei ole vajalik)	19 päeva pärast koorumist või pinnale ujumisel
Pimephales promelas Tüse tömpnina	BSN, helvessööt, FBS	BSN	BSN48, helvessööt	2–3 korda päevas	Kui koorumise määr on 90 %	2 päeva pärast koorumist
Danio rerio Vöödiline daanio	BSN, helvessööt	Kaubanduslik vastse-sööt, algloomad (β), valk (γ)	BSN48, helvessööt	BSN – kord päevas; helvessööt – kaks korda päevas	Kui koorumise määr on 90 %	2 päeva pärast koorumist
Oryzias latipes Jaapani riisikala	Helvessööt	BSN, helvessööt (või algloomad või keriloomad)	BSN48, helvessööt (või keriloomad)	BSN – kord päevas; helvessööt – kaks korda päevas või helvessööt ja keriloomad – kord päevas	Ei kohaldata	6–7 päeva pärast kudemist
Suudmeala- ja merekalad						
Cyprinodon variegatus Hammaskarp	BSN, helvessööt, FBS	BSN	BSN48	2–3 söötmiskorda päevas	Ei kohaldata	1 päev pärast koorumist või pinnale ujumist
***Menidia* sp.** Hõbeateriin	BSN48, helvessööt	BSN	BSN48	2–3 söötmiskorda päevas	Ei kohaldata	1 päev pärast koorumist või pinnale ujumist

Selgitus

(*) Sööta tuleks anda küllastumiseni. Sööda ülejäägid ja väljaheited tuleks vajaduse korral kõrvaldada, et vältida jäätmete kogunemist.
FBS külmutatud soolase vee krevetid; *Artemia* sp. täiskasvanud isendid.
BSN soolase vee krevettide noorjärgus isendid, äsja koorunud.
BSN48 soolase vee krevettide noorjärgus isendid, 48 tunni vanused.
(α) Rebukotiga vastsed ei vaja toitu.
(β) Segakultuurist filtritud.
(γ) Käärimisprotsessist saadavad graanulid.

02008R0440 — ET — 16.10.2019 — 008.001 — 2448

▼M7

4. liide

MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED OMADUSED

Koostisosa	Piirsisaldus
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Kloorijäägid	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

▼M7

5. liide

STATISTIKAJUHISED TÄHELDATAVA TOIME PUUDUMISE KONTSENTRATSIOONI MÄÄRAMISEKS

Üldosa

Analüüsiüksus on paralleelnõu. Seega tuleks pideva tunnuse, näiteks suuruse puhul arvutada paralleelrühma keskväärtus või mediaanväärtus ja kasutada analüüsimiseks seda paralleelrühma väärtust. Kasutatava testi võimsus peaks olema tõendatud, soovitatavalt igas laboris varem saadud piisavate andmete varal. Iga lõppnäitaja puhul tuleks esitada selline suurusele avalduva mõju väärtus, mida on võimalik tuvastada tõenäosusega 75–80 %, ning teave kasutatava statistilise testi kohta.

Soovitatava statistilise meetodi puhul saavutatav võimsus põhineb andmebaasidel, mis olid käesoleva katsemeetodi väljatöötamise ajal kättesaadavad. Igas laboris tuleks tõendada sellise nõutava võimsuse saavutamise võimekust kas laboris tehtava võimsusanalüüsi kaudu või selle kaudu, et tõendatakse, et ühegi näitaja variatsioonikordaja ei ole suurem kui katsejuhendi koostamisel kasutatud variatsioonikordajate 90. protsentiil. Kõnealused variatsioonikordajad on esitatud tabelis 1. Kui on teada üksnes paralleelrühma keskväärtus või mediaanväärtus, võib paralleelrühma sisese variatsioonikordaja kõrvale jätta.

Tabel 1

Valitud mageveeliikide variatsioonikordajate 90. protsentiilid

Liik	Näitaja	Paralleelrühmade vaheline variatsioonikordaja	Paralleelrühma sisene variatsioonikordaja
Vikerforell	Pikkus	17,4	9,8
	Kehamass	10,1	28
Tüse tõmpnina	Pikkus	16,9	13,5
	Kehamass	11,7	38,7
Vöödiline daanio	Pikkus	43,7	11,7
	Kehamass	11,9	32,8

Peaaegu kõikide statistiliste testide puhul, mida kasutatakse laboris tehtavate toksikoloogiliste uuringute hindamiseks, soovitakse võrrelda katserühmasid kontrollrühmaga. Seepärast ei ole asjakohane nõuda olulisuse tuvastamisel dispersioonanalüüsi F-testi kasutamist enne Dunnetti või Williamsi testi või Kruskali-Wallise testi kasutamist enne Jonckheere'i-Terpstra, Manni-Whitney või Dunni testi (Hochberg ja Tamhane, 1987; Hsu, 1996; Dunnett, 1955, 1964; Williams, 1971, 1972, 1975, 1977; Robertson *et al.*, 1988; Jonckheere, 1954; Dunn, 1964).

Dunnetti test hõlmab kohandust mitmese võrdluse suhtes ning F-testi eelnev kasutamine kontrolltestina mõjutab negatiivselt Dunnetti testiga saadavate valepositiivsete ja valenegatiivsete tulemuste määra. Samamoodi säilib muutujate sammuviisilise elimineerimisega Williamsi või Jonckheere'i-Terpstra testis olulisusnivool 0,05 igas etapis valepositiivsete tulemuste üldmäär 5 % ning F-testi või Kruskali-Wallise testi eelnev kasutamine kontrolltestina mõjutab seda määra ja asjaomase testi võimsust negatiivselt. Manni-Whitney ja Dunni testi on vaja kohandada mitmese võrdluse jaoks ning selleks soovitatakse kasutada Bonferroni-Holmi kohandust.

Valdavat osa kõnealuste testide aluseks olevate eelduste kontrollimist ja hüpoteesi testimist käsitlevatest soovitustest on põhjalikult kirjeldatud viidatud dokumendis OECD (2006), mis sisaldab ka ulatuslikku kirjanduse loetelu.

▼M7

Kontrollrühmade andmete töötlemine lahusti kasutamise korral

Lahusti kasutamise korral tuleks katses kasutada nii lahjendusveega kontrolli kui ka lahustiga kontrolli. Nimetatud kahte kontrollrühma tuleks iga näitaja puhul võrrelda ja kui nende vahel olulist erinevust ei tuvastata, siis nende andmed statistilise analüüsi jaoks ühte koondada. Vastasel juhul tuleks täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks või EC_x hindamiseks kasutada lahustiga kontrolli ning lahjendusveega kontroll kõrvale jätta. Tutvuge nõuetekohasuse kriteeriumidest (punkt 7) tuleneva piiranguga.

Pikkuse, kehamassi, koorumiseni jõudnud marjaterade osakaalu, vastsete suremuse, kõrvalekaldega vastsete osakaalu ning esimese ja viimase koorumispäeva ja pinnale ujumise päeva puhul tuleks lahjendusveega kontrolli ja lahustiga kontrolli võrdlemiseks olulisusnivool 0,05 kasutada T-testi või Manni-Whitney testi ning kõik uuritava kemikaaliga rühmad kõrvale jätta. Sellise testi tulemused tuleks esitada katseprotokollis.

Suurust (pikkus ja kehamass) käsitlevad andmed

Iga kala puhul mõõdetud pikkuse ja massi andmed võivad olla normaaljaotusega või lognormaalse jaotusega. Kummalgi juhul on paralleelrühmade keskväärtused üldjuhul normaaljaotusega, nagu nähtub tsentraalsest piirteoreemist ja nagu kinnitavad kolme mageveeliigi varases arengujärgus isenditega tehtud enam kui 100 uuringu andmed. Teise võimalusena võib juhul, kui katseandmed või andmebaasides olevad varasemad andmed viitavad iga kala puhul mõõdetud suuruseandmete lognormaalsele jaotusele, arvutada iga üksiku kala andmete põhjal paralleelrühma keskväärtuse logaritmi ja võtta analüüsitavateks andmeteks nende paralleelrühma keskväärtuse logaritmide antilogaritmid.

Tuleks hinnata andmete vastavust normaaljaotusele ja andmete hajuvuse homogeensust. Selleks tuleks kasutada sellise dispersioonanalüüsi mudeliga saadud hälbeid, milles ainus sõltumatu muutuja on kontsentratsioon. Võib kasutada hajuvusdiagrammi, tulpdiagrammi või tüvi-leht-diagrammi visuaalset hindamist. Teise võimalusena võib kasutada formaalset testi, näiteks Shapiro-Wilki või Andersoni-Darlingi testi. Hajuvuse homogeensuse hindamiseks võib kasutada hajuvusdiagrammi visuaalset analüüsi või formaalset Levene'i testi. Normaaljaotust ja hajuvuse homogeensust on vaja hinnata üksnes parameetrilise (nt Williamsi või Dunnetti) testi puhul.

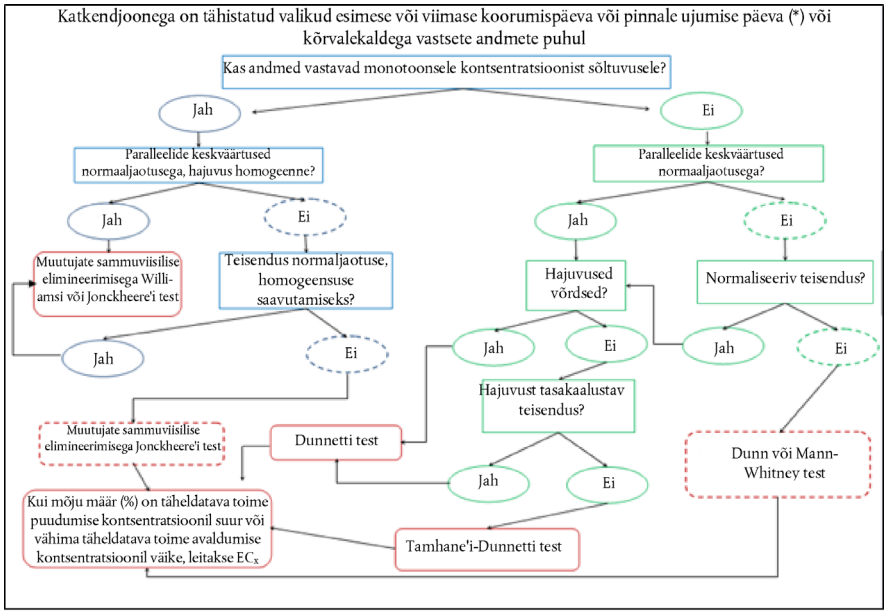
Tuleks pöörata tähelepanu võimalikele võõrväärtustele ja nende mõjule analüüsitulemustele. Võib kasutada Tukey võõrväärtuste testi ja eespool kirjeldatud hälbediagrammide visuaalset hindamist. Tuleks silmas pidada, et vaatlused põhinevad paralleelrühmal tervikuna, mistõttu võõrväärtus tuleks analüüsist välja jätta üksnes pärast hoolikat kaalumist.

Katseplaani eripära ja bioloogiliste eeldustega sobivad statistilised testid on muutujate sammuviisilise elimineerimisega trenditestid, näiteks Williamsi või Jonckheere'i-Terpstra test. Nende testid eeldavad monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust ning tuleks hinnata andmete vastavust sellele eeldusele. Seda võib teha visuaalselt hajuvusdiagrammi alusel, mis väljendab paralleelrühmade keskväärtuste sõltuvust katsekontsentratsioonidest. On kasulik kanda sellise hajuvusdiagrammi peale sirgjoon segmentidena, mis ühendavad omavahel igale kontsentratsioonile vastavaid keskväärtusi, mida on kaalutud paralleelrühma suurusega. Sellise segmentidest koosneva sirgjoone suur kõrvalekalle monotoonsusest võib osutada muu testi kui trenditesti kasutamise vajadusele. Teise võimalusena võib kasutada formaalset testi. Lihtsa formaalse testina võib arvutada igale kontsentratsioonile vastavate keskväärtuste lineaarsed ja ruutkontrastid. Kui ruutkontrast on statistiliselt oluline, ent lineaarne kontrast mitte, viitab see võimalikule monotoonsusega seotud probleemile, mida tuleks diagrammide alusel täiendavalt analüüsida. Normaaljaotuse või hajuvuse homogeensusega seotud võimalike probleemide korral võib kõnealused kontrastid leida astakteisendatud andmete põhjal. Võib kasutada muid meetodeid, näiteks Bartholomew' testi monotoonsuse suhtes, kuid need muudavad analüüsi keerukamaks.

▼M7

Joonis 2

Täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramise vooskeem suurust (pikkus ja kehamass) käsitlevate andmete puhul



(*) Nende näitajate puhul ei ole parameetrilise analüüsi või mudeli eeldused kunagi täidetud.

Täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks kasutatakse Williamsi või Jonckheere'i-Terpstra testi astmelist rakendamist, välja arvatud juhul, kui andmed ei vasta sellise testi nõuetele. Neid meetodeid on üksikasjalikult kirjeldatud viites OECD (2006). Andmete puhul, mis ei vasta muutujate sammuviisilise elimineerimisega trenditesti nõuetele, võib kasutada Dunnetti või Tamhane'i-Dunnetti (T3) testi; kumbki neist hõlmab kohandust mitmese võrdluse võimaldamiseks. Nende testide puhul eeldatakse normaaljaotust ning Dunnetti testi puhul ka hajuvuse homogeensust. Kui need tingimused ei ole täidetud, võib kasutada Dunni mitteparameetrilist testi. Kõiki nimetatud teste on üksikasjalikult kirjeldatud viites OECD (2006). Joonisel 2 on esitatud ülevaade sellest, kuidas valida sobiv test.

Marjaterast koorumine ja vastsete elulemus

Analüüsitavad andmed väljendavad koorumiseni jõudnud marjaterade või ellujäänud vastsete osakaalu igas paralleelrühmas. Kõnealust osakaalu tuleks hinnata binoomjaotuse ülehajuvuse suhtes, mis on selliste mõõtmiste puhul tavaline, kuid mitte universaalne. Sobiva testi valimise juhised on esitatud joonisel 3 vooskeemina; vastav üksikasjalik kirjeldus on esitatud tekstis.

Tavaliselt kasutatakse kahte testi. Need on Tarone'i C(α)-test (Tarone, 1979) ja hii-ruut-test; kumbagi neist rakendatakse eraldi iga katsekontsentratsiooni puhul. Kui isegi vaid ühe katsekontsentratsiooni puhul täheldatakse binoomjaotuse ülehajuvust, tuleks kasutada meetodeid, mis võimaldavad seda arvesse võtta.

Valem 1

Tarone'i C(α)-test (Tarone, 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

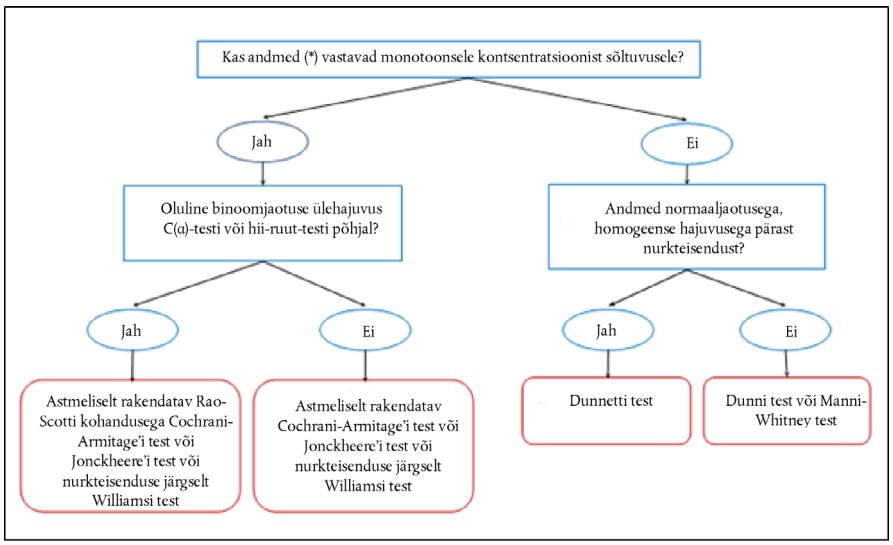
Selles valemis on konkreetsel kontsentratsioonil saadud keskmine osakaal, **m** on paralleelnõude arv, $\mathbf{n_j}$ on isendite arv paralleelrühmas **j** ja $\mathbf{x_j}$ on selles paralleelrühmas kemikaalist mõjutatud, st koorumata jäänud või surnud isendite arv. Testi

▼M7

rakendatakse eraldi iga kontsentratsiooni puhul. Seda testi võib vaadelda kohandatud hii-ruut-testina, kuid testi võimsust käsitlevatest Tarone'i tehtud piiratud simulatsioonidest nähtub, et selle võimsus ületab hii-ruut-testi oma.

Joonis 3

Täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramise vooskeem marjaterast koorumise ja vastsete suremuse andmete puhul



(*) Andmed väljendavad osakaalu paralleelrühmas.

Kui ei leita olulisi tõendeid binoomjaotuse ülehajuvuse kohta, võib kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega Cochrani-Armitage'i testi. Selle testi puhul ei võeta arvesse paralleelide olemasolu, mistõttu kõnealuste tõendite esinemise korral soovitatakse kasutada Rao-Scotti kohandusega Cochrani-Armitage'i testi, mille puhul võetakse arvesse nii paralleelide olemasolu, paralleelrühmade suurust kui ka binoomjaotuse ülehajuvust. Muu võimaliku testina võib kasutada näiteks muutujate sammuviisilise elimineerimisega Williamsi või Jonckheere'i-Terpstra testi või Dunnetti testi, nagu on kirjeldatud suurust käsitlevate andmete puhul. Neid teste võib rakendada sõltumata sellest, kas binoomjaotuse ülehajuvust täheldatakse või mitte, kuid nende võimsus on mõnevõrra väiksem (Agresti, 2002; Morgan, 1992; Rao ja Scott, 1992, 1999; Fung *et al.*, 1994, 1996).

Esimene ja viimane koorumispäev ja pinnale ujumise päev

Asjaomane näitaja on täisarv, mis väljendab päevade arvu katse algusest kuni konkreetses paralleelnõus asjaomase vaatluse tegemise päevani. Sellise näitaja väärtused on üldjuhul väga piiratud ulatusega ja seotud väärtuste osakaal on sageli suur, näiteks täheldatakse, et esimene koorumispäev on kõikides kontrollrühma paralleelides ja võib-olla ühel või kahel väikesel katsekontsentratsioonil sama. Selliste andmete puhul ei ole parameetriline test, näiteks Williamsi või Dunnetti test asjakohane. Kui ei ole tõendeid olulise monotoonsusest kõrvalekaldumise kohta, võib kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra testi, mille võimsus uuritava kemikaali mõju tuvastamisel on väga suur. Muul juhul võib kasutada Dunni testi.

Kõrvalekaldega vastsed

Asjaomane näitaja on selliste vastsete arv, kellel leitakse mõni kõrvalekalle. Seda näitajat iseloomustab sageli madal esinemissagedus ja mõned sellega seotud probleemid on samad kui esimese koorumispäeva puhul; peale selle täheldatakse mõnikord selle näitaja korrapäratut kontsentratsioonist sõltuvust. Kui andmed väljendavad vähemalt ligikaudselt monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust, võib kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra testi, mille võimsus mõju tuvastamisel on suur. Muul juhul võib kasutada Dunni testi.

▼**M7**

VIITED

Agresti, A. (2002). Categorical Data Analysis. Teine väljaanne. Wiley, Hoboken.

Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50: 1096–1121.

Dunn, O. J. (1964). Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 6: 241–252.

Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.

Fung, K. Y., Krewski, D., Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1994). Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data. *Risk Anal.* 14: 639–648.

Fung, K. Y., Krewski, D., ja Smythe, R. T. (1996). A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay. *Can. J. Stat.* 24: 431–454.

Hochberg, Y., ja Tamhane, A. C. (1987). Multiple Comparison Procedures. Wiley, New York.

Hsu, J. C. (1996). Multiple Comparisons: Theory and Methods. Chapman and Hall / CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere, A. R. (1954). A distribution-free k-sample test against ordered alternatives. *Biometrika* 41: 133.

Morgan, B. J. T. (1992). Analysis of Quantal Response Data. Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577–585.

Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Stat. Med.* 18: 1373–1385.

Robertson, T., Wright, F. T., ja Dykstra, R. L. (1988). Order restricted statistical inference. Wiley.

Tarone, R. E. (1979). Testing the goodness of fit of the Binomial distribution. *Biometrika* 66: 585–590.

Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.

Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519–531.

Williams D. A. (1975). The analysis of binary responses from toxicological experiments involving reproduction and teratogenicity. *Biometrics* 31: 949–952.

Williams, D. A. (1977). Some inference procedures for monotonically ordered normal means. *Biometrika* 64: 9–14.

▼M7

6. liide

STATISTIKAJUHISED ANDMETE HINDAMISEKS REGRESSIOONI TEEL

Üldosa

Mudeli sobitamisel vaatlusandmetega kasutatakse paralleelrühma keskväärtust (pikkuse ja massi puhul) või osakaalu paralleelrühmas (marjaterast koorumise ja vastsete suremuse puhul) (OECD, 2006).

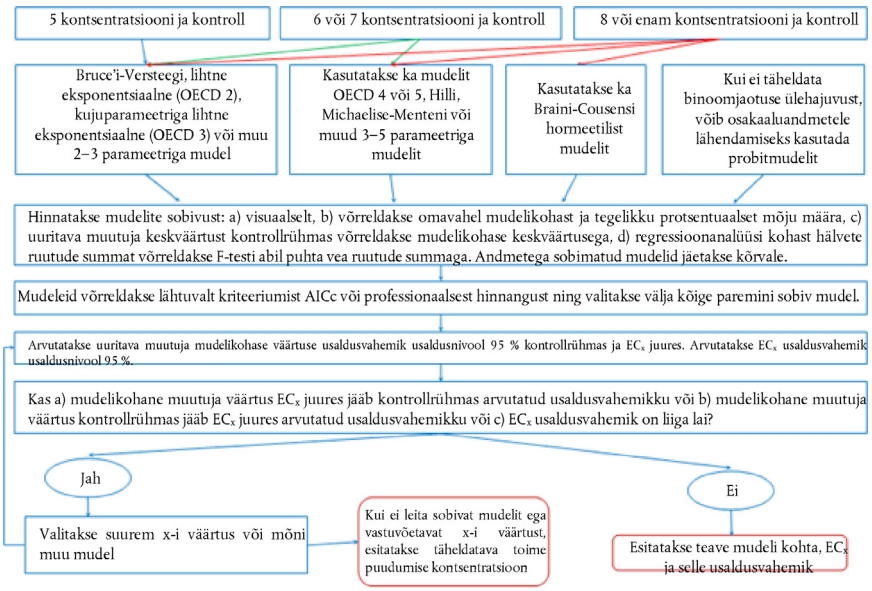
Üldjuhul on soovitatav kasutada paralleelrühma suurusega kaalutud regressioonanalüüsi. On võimalik kasutada ka muud kaalumismeetodit, näiteks kaalumist hinnangulise keskväärtusega või nii sellega kui ka paralleelrühma suurusega. Kaalumine sama kontsentratsiooniga proovide andmete hajuvuse pöördväärtusega ei ole soovitatav (Bunke *et al.*, 1999; Seber ja Wild, 2003; Motulsky ja Christopoulos, 2004; Huet *et al.*, 2003).

Analüüsile eelneval andmete teisendamisel tuleks alati säilitada vaatluste sõltumatus ning EC_x ja selle usaldusvahemikku tuleks väljendada algsetes, mitte teisendatud mõõtühikutes. Näiteks ei ole pikkuse logaritmi 20 % suurune muutus sama kui pikkuse 20 % suurune muutus (Lyles *et al.*, 2008; Draper ja Smith, 1999).

Joonisel 4 kujutatud vooskeem annab ülevaate EC_x hindamisest. Üksikasjalik kirjeldus on esitatud allpool tekstis.

Joonis 4

Vooskeem EC_x hindamiseks paralleelrühmas täheldatava keskmise pikkuse või massi või koorumiseni jõudnud marjaterade osakaalu või vastsete suremuse puhul (üksikasjad on esitatud tekstis)



Kaalutlused marjaterast koorumise ja vastsete suremuse andmete puhul

Marjaterast koorumise ja vastsete suremuse andmete puhul saadakse üldjuhul parim tulemus väärtuse vähenemisel põhineva mudeli sobitamisega, juhul kui ei kasutata probitmudelit, nagu on kirjeldatud allpool. See tähendab, et mudelis ei tohiks kasutada koorumata jäänud marjaterade või surnud vastsete osakaalu. Selle põhjuseks on asjaolu, et EC_x väljendab kontsentratsiooni, mille juures täheldatakse x % suurust muutust kontrollrühma keskväärtusega võrreldes. Kui kontrollrühmas jääb koorumata 5 % marjateradest ja mudeliga hinnatakse koorumata jäänud marjaterade osakaalu, väljendab EC_{20} kontsentratsiooni, mille juures täheldatakse 20 % suurust muutust koorumata jäänud marjaterade osakaalus, mis

▼M7

on kontrollrühmas 5 %, see tähendab muutust väärtusega 0,2 × 0,05 = 0,01 ehk 1 protsendipunkt, mis vastab koorumata jäänud marjaterade osakaalu suurenemisele 6 protsendini. Nii väikest muutust ei ole võimalik olemasolevate andmete alusel mõistlikult hinnata ja see ei ole bioloogiliselt oluline. Kui aga mudelis kasutatakse koorumiseni jõudnud marjaterade osakaalu, on see kirjeldatud näite puhul kontrollrühmas 95 % ning selle vähenemine 20 % kontrollrühma keskväärtusega võrreldes tähendab muutust väärtusega 0,95 × 0,2 = 0,18 ehk koorumise edukuse vähenemist 95 protsendilt 77 protsendini (= 95 – 18); sellisel juhul on toime avaldumise kontsentratsiooni võimalik hinnata ja see pakub eeldatavalt suuremat huvi. Kõnealust probleemi ei teki suurust väljendavate mõõtmisandmete puhul, ehkki negatiivne mõju suurusele tähendab tavaliselt suuruse vähenemist.

Mudelid suuruse (pikkus ja kehamass) ning marjaterast koorumise edukuse ja vastsete elulemuse hindamiseks

Kõiki käsitletud mudeleid, välja arvatud Braini-Cousensi hormeetiline mudel, on kirjeldatud ja soovitatud viites OECD (2006). OECD mudeleid 2–5 on seoses ökotoksilisuse katsetega käsitletud ka viites Slob (2002). Loomulikult on palju muidki mudeleid, mis võivad kasulikud olla. Bunke *et al*. (1999) esitavad rea mudeleid, mida ei ole siin käsitletud, samuti leidub palju viiteid muudele mudelitele. Allpool loetletud mudeleid soovitatakse kui ökotoksilisuse katsete puhul iseäranis sobivaid mudeleid ning need on laialdaselt kasutusel.

5 katsekontsentratsiooni lisaks kontrollrühmale

— Bruce'i-Versteegi mudel

— Lihtne eksponentsiaalne mudel (OECD 2)

— Kujuparameetriga eksponentsiaalne mudel (OECD 3)

— Alampiiriga lihtne eksponentsiaalne mudel (OECD 4)

6 katsekontsentratsiooni lisaks kontrollrühmale

— Kujuparameetri ja alampiiriga eksponentsiaalne mudel (OECD 5)

— Michaelise-Menteni mudel

— Hilli mudel

Hormeesile viitavate visuaalsete tõendite olemasolu korral (marjaterast koorumise edukuse ja vastsete elulemuse puhul ebatõenäoline, kuid suurusega seotud vaatlusandmete puhul mõnikord täheldatav):

— Braini-Cousensi hormeetiline mudel (Brain ja Cousens, 1989).

Alternatiivsed mudelid koorumata jäänud marjaterade osakaalu ja vastsete suremuse hindamiseks

— Nende näitajate puhul võib suurenemisel põhinevate mudelite sobitamisel kasutada probit- või logistilisi mudeleid, kui ei ole tõendeid binoomjaotuse ülehajuvuse kohta ja mudeli sobitamisel hinnatakse kontrollrühma asjaomast näitajat. See meetod ei ole eelistatud, kuna selle puhul käsitletakse analüüsiüksusena mitte paralleelnõud, vaid üksikisendit (Morgan, 1992; O'Hara Hines ja Lawless, 1993; Collett, 2002, 2003).

Konkreetse mudeli sobivus andmetega

— Vaatlusandmete kohast ja mudelile vastavat hinnangulist protsentuaalset vähenemist igal katsekontsentratsioonil võrreldakse visuaalselt (Motulsky ja Christopoulos, 2004; Draper ja Smith, 1999).

— F-testi abil võrreldakse regressioonanalüüsi kohast vea ruutkeskmist puhta vea ruutkeskmisega (Draper ja Smith, 1999).

— Veendutakse, et mudeli kõik argumendid erinevad oluliselt nullist (st tehakse kindlaks, kas mudeli kõik argumendid on olulised) (Motulsky ja Christopoulos, 2004).

▼M7

— Koostatakse diagramm, mis väljendab regressioonanalüüsi teel saadud hälvete sõltuvust katsekontsentratsioonist ja kus kontsentratsiooni puhul võib kasutada logaritmskaalat. Sellest diagrammist ei tohiks nähtuda mingit sõltuvust; punktid peaksid olema nullkõrgusel asuva horisontaaljoone suhtes juhuslikult hajutatud.

— Andmete vastavust normaaljaotusele ja nende hajuvuse homogeensust tuleks hinnata samal viisil, nagu on kirjeldatud 5. liites.

— Peale selle tuleks regressioonimudeli kohaste hälvete vastavust normaaljaotusele hinnata samade meetoditega, mida on kirjeldatud 5. liites seoses dispersioonanalüüsil saadavate hälvetega.

Mudelite võrdlemine

— Kasutatakse Akaike informatsioonikriteeriumi (AICc). Väiksem AICc väärtus tähistab paremat sobivust ning kui AICc(B) – AICc(A) ≥ 10, siis on mudel A peaaegu kindlalt parem kui mudel B (Motulsky ja Christopoulos, 2004).

— Kahte mudelit võrreldakse omavahel visuaalselt; hinnatakse, kui hästi kumbki mudel vastab eespool kirjeldatud sobivuse kriteeriumidele.

— Soovitatakse rakendada parsimoonia põhimõtet, mille kohaselt kasutatakse lihtsaimat mudelit, mis sobib andmetega piisavalt hästi (Ratkowsky, 1993; Lyles *et al.*, 2008).

Hinnangulise EC_x usaldusväärsus

EC_x usaldusvahemik ei tohiks olla liiga lai. Kasutuskõlbliku EC_x usaldusvahemiku suurima laiuse üle otsustamiseks tuleb kasutada statistilist hindamist. Simulatsioonidest regressioonimudelite sobitamiseks marjaterast koorumise ja suuruse andmetega nähtub, et EC_x (x = 10, 20 või 30) usaldusvahemikest umbes 75 % ei hõlma üle kahe katsekontsentratsiooni. See annab üldise ettekujutuse sellest, milline väärtus on aktsepteeritav, ning praktilise ettekujutuse sellest, mis on saavutatav. Paljud autorid kinnitavad vajadust esitada usaldusvahemik mudeli kõikide parameetrite puhul ning toonitavad, et mudeli parameetri lai usaldusvahemik viitab vastuvõetamatule mudelile (Ott ja Longnecker, 2008; Alvord ja Rossio, 1993; Motulsky ja Christopoulos, 2004; Lyles *et al.*, 2008; Seber ja Wild, 2003; Bunke *et al*., 1999; Environment Canada, 2005).

EC_x (või mudeli mõne muu parameetri) usaldusvahemik ei tohiks hõlmata nulli (Motulsky ja Christopoulos, 2004). See on regressioonanalüüsis samaväärne minimaalse olulise erinevusega, millele hüpoteesi kontrollimiseks kasutatavate lähenemisviiside puhul tihti viidatakse (nt Wang *et al.*, 2000). Ühtlasi vastab see vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioonil saadud keskväärtuse usaldusvahemikule, mis ei hõlma kontrollrühma keskväärtust. Tuleks hinnata, kas parameetri hinnanguline väärtus on teaduslikult usutav. Näiteks kui usaldusvahemik väärtusel y = 0 on ± 20 %, ei ole EC_{10} hinnanguline väärtus usutav. Kui mudeli põhjal peaks kontsentratsioonil C avalduva mõju ulatus olema 20 % ning sellel ja madalamal kontsentratsioonil täheldatav suurim mõju on 10 %, ei ole EC_{20} väärtus usutav (Motulsky ja Christopoulos, 2004; Wang *et al.*, 2000; Environment Canada, 2005).

EC_x puhul ei tohiks olla vajadust rakendada ekstrapoleerimist kasutatud kontsentratsioonide vahemikust väljapoole (Draper ja Smith, 1999; OECD, 2006). Näiteks võiks EC_x väärtus olla üldjuhul kõige rohkem umbes 25 % väiksem kui madalaim katses kasutatud kontsentratsioon või umbes 25 % suurem kui kõrgeim kasutatud kontsentratsioon.

VIITED

Alvord, W. G., ja Rossio, J. L. (1993). Determining confidence limits for drug potency in immunoassay. *J. Immunol. Methods* 157: 155–163.

Brain, P., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res.* 29: 93–96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B., ja Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33: 197–240.

Collett, D. (2002). Modelling Binary Data. Teine väljaanne. Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003). Modelling Survival Data in Medical Research. Teine väljaanne. Chapman and Hall, London.

Draper, N. R., ja Smith, H. (1999). Applied Regression Analysis. Kolmas väljaanne. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; aruanne EPS 1/RM/46.

Huet, S., Bouvier, A., Poursat, M.-A., ja Jolivet, E. (2003). Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples. Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M., ja Cooper, C. R. (2008). Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data. *Contemp. Clin. Trials* 29 (6): 878–886.

Morgan, B. J. T. (1992). Analysis of Quantal Response Data. Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., ja Christopoulos, A. (2004). Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting. Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J., ja Lawless, J. F. (1993). Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time. *Biometrics* 49: 107–121.

OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

Ott, R. L., ja Longnecker, M. T. (2008). An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. Kuues väljaanne. Brooks-Cole, Belmont, CA.

Ratkowsky, D. A. (1993). Principles of nonlinear regression. *J. Ind. Microbiol.* 12: 195–199.

Seber, G. A. F., ja Wild, C. J. (2003). Nonlinear Regression. Wiley.

Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298–312.

Wang, Q., Denton, D. L., ja Shukla, R. (2000). Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 113–117.

▼M7

C.48. **Lühiajaline kalade paljunemise katse**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 229 (2012). Vajadus töötada välja ja valideerida kaladega tehtav katse, millega saab välja selgitada endokriinsüsteemi mõjutavaid kemikaale, tuleneb murest, et kemikaalid võivad keskkonnas esinevas kontsentratsioonis avaldada kahjulikku mõju nii inimesele kui ka loomadele, kuna nad mõjutavad endokriinsüsteemi. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate juhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et selgitada sõeluuringutega välja võimalikud endokriinsüsteemi kahjustajad ja teha nendega katseid. Üks selle tegevuse eesmärk oli töötada välja katsejuhend sõeluuringu tegemiseks, et selgitada välja kalade endokriinsüsteemi mõjutavad kemikaalid. Lühiajaline kalade paljunemise katse on läbinud ulatusliku valideerimisprogrammi, mis hõlmas teatavate kemikaalide laboritevahelisi uuringuid ja millega tõendati, et katse annab asjakohaseid ja usaldusväärseid tulemusi selliste kemikaalide kindlakstegemisel, mis eri mehhanismide, sealhulgas endokriinse toime kaudu mõjutavad kalade paljunemist (1–5). Kõik OECD katsejuhendi kohased lõppnäitajad on valideeritud tüseda tõmpnina puhul ning osa lõppnäitajatest on valideeritud ka Jaapani riisikala puhul (vitellogeniin ja teisesed sootunnused) ja vöödilise daanio puhul (vitellogeniin). Valideerimise on vastastikuse eksperdihinnangu korras osaliselt läbi vaadanud OECD katsejuhendite programmi riiklike koordinaatorite määratud eksperdirühm (6), samuti on selle läbi vaadanud Ameerika Ühendriikide Keskkonnakaitseameti volitatud sõltumatu eksperdirühm (29). Katse eesmärk ei ole kindlaks teha konkreetset hormonaalse häire mehhanismi, kuna katseloomadel on töökorras hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg, mis võib reageerida seda telge mõjutavatele kemikaalidele eri tasanditel.

2. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* sõeluuringus hoitakse sugeküpseid isaskalu ja marja heitvaid emaskalu üheskoos ning nende elutsükli piiratud perioodi (21 päeva) jooksul kokkupuutes uuritava kemikaaliga. Kõnealuse 21-päevase kokkupuuteperioodi lõpus mõõdetakse isas- ja emaskaladel kahte bioloogilist lõppnäitajat, mille põhjal tehakse järeldused uuritava kemikaali endokriinse toime kohta; need lõppnäitajad on vitellogeniin ja teisesed sootunnused. Vitellogeniini määratakse nii tüseda tõmpnina, jaapani riisikala kui ka vöödilise daanio puhul, ent teiseseid sootunnuseid mõõdetakse üksnes tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul. Peale selle jälgitakse katse vältel iga päev kvantitatiivselt sigivust. Samuti säilitatakse sugunäärmed, mille histopatoloogilise analüüsi alusel saab hinnata katseloomade paljunemisvõimet ja koguda seeläbi tõendusmaterjali muudel lõppnäitajatel põhinevate järelduste toetuseks.

3. Käesolevat bioloogilist katsemeetodit kasutatakse *in vivo* paljunemise sõeluuringuks ja selle rakendamist tuleks vaadelda endokriinsüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku (30) osana. Lühiajalist kalade paljunemise katset käsitletakse selles kontseptuaalses raamistikus 3. tasandi *in vivo* katsena, millest saadakse teavet teatud kindla(te) endokriinse(te) mehhanismi(de) või raja/radade kohta.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. Vitellogeniini sünteesitakse tavaliselt ovipaarsete selgroogsete emasloomade maksas vastuseks veres ringlevale endogeensele östrogeenile. See on munarebu valkude eelkäija ja pärast sünteesimist maksas liigub see vere kaudu munasarjadesse, kus arenevad munarakud seda seovad ja modifitseerivad. Vitellogeniin on peaaegu tuvastamatu isaskalade ja ebaküpsete emaskalade vereplasmas, kuna sellistel kaladel ei ole vereringes piisavalt östrogeeni, kuid eksogeense östrogeeniga stimuleerimise korral on nende maks võimeline vitellogeniini sünteesima ja verre eritama.

▼M7

5. Vitellogeniini mõõtmise kaudu tehakse kindlaks kemikaalid, millel on eri viisidel avalduv östrogeenne mõju. Östrogeense mõjuga kemikaale on võimalik tuvastada vitellogeniini mõõtmisega isaskaladel ja see on eelretsenseeritud teaduskirjanduses hästi tõendatud (nt viide 7). Samuti on tõendatud, et vitellogeniini toodetakse pärast kokkupuudet aromatiseeritavate androgeenidega (8, 9). Kui emaskalade veres langeb östrogeeni tase, näiteks seepärast, et inhibeeritakse ensüüm aromataasi, mis muundab endogeense androgeeni looduslikuks östrogeeniks 17β-östradiooliks, põhjustab see vitellogeniini kontsentratsiooni vähenemise; seda kasutatakse aromataasi inhibeerivate kemikaalide tuvastamiseks (10, 11). Östrogeense mõjuga kemikaaliga või aromataasi inhibiitoriga kokkupuutele järgneva vitellogeniinitaseme muutumise bioloogiline olulisus on hästi tõendatud. Siiski on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus, näiteks hepatotoksilisus.

6. Välja on töötatud ja tavakasutamiseks edukalt standarditud mitu mõõtmismeetodit. Nende hulgas on liigispetsiifilised ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodid, mille puhul kasutatakse immunokeemiat vitellogeniini mõõtmiseks üksikisenditelt saadud väikestes vere- või maksaproovides (12–18). Vitellogeniini mõõtmiseks võetakse tüseda tõmpnina vereproov, vöödilise daanio vereproov või pea-saba homogenaat ja jaapani riisikala maks. Jaapani riisikala puhul on vitellogeniini verest ja maksast määramise tulemused omavahel heas korrelatsioonis (19). Soovitatavad proovivõtumeetodid vitellogeniini määramiseks on esitatud 6. liites. Vitellogeniini mõõtmise komplektid on laialdaselt kättesaadavad; sellised komplektid peaksid põhinema valideeritud liigispetsiifilisel ELISA meetodil.

7. Teatavate liikide isaskalade teisesed sootunnused on väliselt nähtavad ja mõõdetavad ning sõltuvad endogeensete androgeenide tasemest vereringes; see on nii tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul, kuid mitte vöödilise daanio puhul, kellel ei ole mõõdetavaid teiseseid sootunnuseid. Emaskaladel säilib võime omandada isaskalale iseloomulikud teisesed sootunnused, kui nad puutuvad kokku vees olevate androgeensete kemikaalidega. Teaduskirjandusest võib leida mitu uuringut, milles on tõendatud tüseda tõmpnina (20) ja jaapani riisikala (21) selline reageerimine androgeensetele kemikaalidele. Teiseste sootunnuste vähenemist isaskaladel tuleks tõlgendada ettevaatusega, kuna selliste andmete statistiline võimsus on väike; tõlgendamisel tuleks toetuda eksperdiarvamusele ja võtta arvesse tõendite kaalukust. Vöödilise daanio kasutamisele selles katses on piiranguid, kuna sellel kalal puuduvad mõõdetavad teisesed sootunnused, mille kaudu hinnata reaktsiooni androgeense mõjuga kemikaalidele.

8. Tüseda tõmpnina puhul on eksogeensete androgeenidega kokkupuute peamine näitaja pulmarüü köbrukeste arv emaskala ninamikul. Jaapani riisikala puhul on nn papillaarjätkete arv peamine tunnus, mis viitab emaskala kokkupuutele eksogeensete androgeensete kemikaalidega. Soovitatavad meetodid tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala sootunnuste hindamiseks on esitatud vastavalt 5A ja 5B liites.

9. Kõnealuse 21-päevase kaladega tehtava katse käigus hinnatakse kvantitatiivselt marja tootmist ning säilitatakse sugunäärmed, et teha neile vajaduse korral histopatoloogiline analüüs. Mõni reguleeriv asutus võib nõuda selle täiendava lõppnäitaja hindamist katseloomade paljunemisvõimest täielikuma ülevaate saamiseks või juhul, kui kokkupuude kemikaaliga ei mõjuta vitellogeniinitaset ja teiseseid sootunnuseid. Ehkki mõni lõppnäitaja (nt vitellogeniini süntees isaskalades ja köbrukeste moodustumine emaskaladel) võib olla suure diagnostilise väärtusega, ei ole muude lõppnäitajate puhul (nt sigivus ja sugunäärmete histopatoloogilise analüüsi tulemused) eesmärk teha üheselt kindlaks konkreetsed toimemehhanismid raku tasandil. Pigem võimaldavad kasutatavad lõppnäitajad koos teha järeldusi võimalike endokriinsete häirete kohta ja kavandada selle põhjal täiendavaid katseid. Ehkki sigivus ei sõltu üksnes endokriinsest toimest, on selle lõppnäitaja kasutamine oluline, kuna selle tundlikkus teadaoleva endokriinse toimega kemikaalide

▼M7

suhtes on tõendatud (5) ning kui mõju sellele ja muudele lõppnäitajatele puudub, võib suurema kindlusega väita, et asjaomane kemikaal ei ole tõenäoliselt endokriinselt aktiivne. Kui aga mõju sigivusele on olemas, on see kaalukas lisatõend endokriinse toime kohta. Juhised andmete tõlgendamiseks ja katsetulemuste vastuvõetavaks lugemise kohta on esitatud allpool käesoleva katsemeetodi kirjelduses.

10. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Katses viiakse paljunemisvõimelised isas- ja emaskalad katsenõudes kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Kuna kalad on täiskasvanud ja paljunemiseas, on kumbagi sugu kerge eristada; seega on võimalik iga lõppnäitaja määramisel sugu arvesse võtta ning on tagatud kalade tundlikkus eksogeensete kemikaalide suhtes. Katse lõpus määratakse kala sugu sugunäärmete makroskoopilise vaatlusega pärast seda, kui kõht on kääridega lahti lõigatud. Vastavate biokatse tingimuste ülevaade on esitatud 2. liites. Katset alustatakse tavaliselt kaladega, kes on võetud kudemisvalmis populatsioonist; vanu kalu ei tohiks kasutada. Juhised seoses kalade vanuse ja paljunemisvõimega on esitatud kalade valimist käsitlevas jaotises. Katses kasutatakse kemikaali kolmes kokkupuutekontsentratsioonis ning veega kontrollrühma ja vajaduse korral ka lahustiga kontrollrühma. Vöödilise daanio puhul kasutatakse iga kontsentratsioonipunkti kohta paralleelselt kahte nõud, millest kummaski on 5 isaskala ja 5 emaskala. Tüseda tõmpnina puhul kasutatakse iga kontsentratsioonipunkti kohta paralleelselt nelja nõud, igas nõus 2 isaskala ja 4 emaskala. Sellega võetakse arvesse isase tüseda tõmpnina territoriaalset käitumist, kuid säilitatakse samal ajal katse piisav statistiline võimsus. Jaapani riisikala puhul kasutatakse iga kontsentratsioonipunkti kohta paralleelselt nelja nõud, igas nõus 3 isaskala ja 3 emaskala. Kalu hoitakse kemikaaliga kokkupuutes 21 päeva ja kalade proovid võetakse kokkupuute 21. päeval. Sigivust hinnatakse iga päev kvantitatiivselt.

12. Proovivõtmisel 21. päeval surmatakse kõik kalad humaanselt. Tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul mõõdetakse teisesed sootunnused (vt 5A ja 5B liide); vöödiliselt daaniolt ja tüsedalt tõmpninalt võetakse vereproovid vitellogeniini määramiseks; vöödiliselt daaniolt võib selle asemel koguda vitellogeniini määramiseks pea ja saba (6. liide); jaapani riisikalalt võetakse vitellogeniini määramiseks maks (6. liide); sugunäärmed fikseeritakse koos terve organismiga või eraldi, et neid vajaduse korral histopatoloogiliselt analüüsida (22).

KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID

13. Katsetulemused on nõuetekohased, kui on täidetud järgmised tingimused:

— suremus veega (või lahustiga) kontrollrühmas ei tohiks kokkupuuteperioodi lõpuks olla suurem kui 10 %;

— lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu kokkupuuteperioodi jooksul olema vähemalt 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist;

— vee temperatuur ei tohiks kogu kokkupuuteperioodi jooksul katsenõudes erineda rohkem kui ± 1,5 °C ja see tuleks hoida vahemikus ± 2 °C katsealuse liigi puhul ette nähtud temperatuurist (2. liide);

— tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus ± 20 % mõõtmistulemuste keskväärtusest;

▼M7

— tuleks esitada tõendid selle kohta, et kalad koevad katse vältel enne kemikaaliga kokkupuudet aktiivselt kõikides paralleelnõudes, sealhulgas kontrollrühmas.

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

14. Tavapärased laboriseadmed, eeskätt järgmised seadmed:

a. hapnikumõõtur ja pH-meeter;

b. seadmed vee kareduse ja leelisuse määramiseks;

c. asjakohased temperatuuri reguleerimise ja soovitatavalt selle pideva jälgimise seadmed;

d. soovitatava biomassisisalduse ja asustustiheduse jaoks piisava suurusega keemiliselt inertsest materjalist mahutid (vt 2. liide);

e. tüseda tõmpnina ja vöödilise daanio kudemissubstraat; vajalikud üksikasjad on esitatud 4. liites;

f. sobiva täpsusega kaal (st täpsusega ± 0,5 mg).

Vesi

15. Katses võib kasutada sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui ± 0,5 pH-ühikut. Selle tagamiseks, et lahjendusvesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi (näiteks põhjustades uuritava kemikaali komplekseerumise), tuleks kindlate ajavahemike järel võtta analüüsimiseks veeproov. Kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskmetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} ja SO_4^{2-}) ning pestitsiidide sisaldus (näiteks fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus), orgaanilise süsiniku üldsisaldus ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks iga kolme kuu järel. Kui on tõendatud, et vee kvaliteet on vähemalt ühe aasta jooksul püsiv, võib sellist määramist teha harvem (näiteks iga kuue kuu järel). Lahjendusvee mõned nõutavad keemilised omadused on esitatud 3. liites.

Katselahused

16. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahus tuleks soovitatavalt valmistada lihtsalt uuritava kemikaali segamise või loksutamisega lahjendusvees; selleks tuleks kasutada mehaanilist töötlust (nt segamist või ultraheli). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne). Lahusti kasutamine ei ole soovitatav. Kui lahusti on siiski vajalik, tuleks katses paralleelselt kasutada lahustiga kontrolli, milles lahusti kontsentratsioon on sama kui uuritava kemikaaliga nõudes. Raskesti uuritava kemikaali puhul võib lahusti olla tehniliselt parim lahendus; sel juhul tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga (23) raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta. Lahusti valiku määravad aine või segu keemilised omadused. OECD juhenddokumendis soovitatakse kontsentratsiooni kuni 100 µl/l, millest tuleks kinni pidada. Ühes hiljutises ülevaates (24) on aga esile tõstetud täiendavad probleemid, mis tekivad, kui endokriinse toime uurimisel kasutatakse lahustit. Seepärast soovitatakse, et kui lahusti on vajalik, peaks selle kontsentratsioon olema tehnilisest teostatavusest lähtuvalt minimaalne (sõltuvalt uuritava kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest).

▼M7

17. Katses kasutatakse läbivoolusüsteemi. Sellises süsteemis lisatakse ja lahjendatakse uuritava kemikaali põhilahust pidevalt (nt dosaatorpumba, proportsionaalse lahjendamise seadme või küllastamissüsteemiga), et tekitada katsekambrites rida eri kontsentratsioone. Põhilahuste ja lahjendusvee voolukiirust tuleks kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel, soovitatavalt iga päev, ja see ei tohiks kogu katse vältel varieeruda rohkem kui 10 %. Tuleks hoiduda kasutamast ebakvaliteetseid plasttorusid või muid materjale, mis võivad sisaldada bioloogiliselt aktiivseid kemikaale. Materjali valimisel läbivoolusüsteemi jaoks tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali võimalikku adsorbeerumist.

Kalade pidamine

18. Katsealused kalad tuleks valida ühest laboripopulatsioonist, soovitatavalt samast parvest, mida on vähemalt kahe nädala vältel enne katset kohandatud selliste veekvaliteedi ja valgustustingimustega, mis sarnanevad katses kasutatavatele tingimustele. On oluline, et biomassisisaldus ja asustustihedus (mõisted on määratletud 1. liites) oleksid katses kasutatavale liigile sobivad (vt 2. liide).

19. Pärast 48-tunnist harjumisperioodi registreeritakse surmajuhtumid ja kohaldatakse järgmisi kriteeriume:

— kui suremus on populatsioonis seitsme päeva jooksul suurem kui 10 %, jäetakse kogu partii kõrvale;

— kui suremus populatsioonis on 5–10 %, lastakse kaladel kohaneda veel seitse päeva; kui kõnealuse järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, jäetakse kogu partii kõrvale;

— kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul väiksem kui 5 %, loetakse partii vastuvõetavaks.

20. Kohanemise ajal, kokkupuutele eelneval perioodil ja kokkupuute ajal ei tohiks kaladel haigusi ravida.

Kokkupuute-eelne periood ja kalade valimine

21. Soovitatakse kasutada ühe kuni kahe nädala pikkust kokkupuute-eelset perioodi, mille vältel kalad on paigutatud tegelikus katses kasutatavatega sarnastesse nõudesse. Kalu tuleks sööta kogu pidamisperioodi ja kokkupuuteperioodi vältel *ad libitum*. Kokkupuuteperioodi tuleks alustada eristatavate sootunnustega kummastki soost täiskasvanud kaladega (nt nende teisesed sootunnused peaksid olema tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul selgelt nähtavad), kes pärinevad labori suguküpsete kalade varudest ja koevad aktiivselt. Üksnes üldise ettekujutuse loomiseks tuleb öelda (ja seejuures ei tohi jätta arvestamata konkreetse kalapartii tegelikku paljunemisvõimet), et tüseda tõmpnina vanus peaks olema ligikaudu 20 (± 2) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril 25 ± 2 °C. Jaapani riisikala vanus peaks olema ligikaudu 16 (± 2) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril 25 ± 2 °C. Vöödilise daanio vanus peaks olema ligikaudu 16 (± 2) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril 26 ± 2 °C. Kokkupuute-eelsel perioodil tuleks marja tootmist hinnata iga päev. Soovitatavalt peaks kudemine olema enne kokkupuuteperioodi algust täheldatav kõikides paralleelnõudes. Siinkohal ei ole võimalik esitada soovitatavat marjaterade arvu päevas, kuid iga kõnealuse liigi puhul on üsna tavaline, et emaskala kohta koetakse päevas keskmiselt üle 10 marjatera. Et tagada paralleelnõude tasakaalustatud jaotus eri katsekontsentratsioonide vahel, tuleks kasutada sellist plokkide randomiseeritud paigutust, mille aluseks on marja tootmise tase.

▼M7

KATSEPLAAN

22. Katses kasutatakse uuritavat kemikaali kolmes kontsentratsioonis, ühte (veega) kontrollrühma ja vajaduse korral ühte lahustiga kontrollrühma. Andmeid võib analüüsida, et teha kindlaks statistiliselt olulised erinevused kemikaaliga kokku puutunud rühma ja kontrollrühma näitajate vahel. Kõnealusest analüüsist ilmneb, kas uuritava kemikaaliga saadud andmeid võib kasutada riskihindamisel või oleks vaja teha täiendav pikemaajaline katse kemikaali kahjuliku mõju (st elulemusele, arengule, kasvule ja paljunemisele avalduv mõju) väljaselgitamiseks (25).

23. Vöödilise daanio puhul võetakse katse 21. päeval isas- ja emaskalad igale kontsentratsioonile vastavast rühmast (5 isas- ja 5 emaskala kummastki paralleelnõust) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniini tase. Jaapani riisikala puhul võetakse katse 21. päeval isas- ja emaskalad igale kontsentratsioonile vastavast rühmast (3 isas- ja 3 emaskala igast paralleelnõust, mida on kokku neli) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniini tase ja teisesed sootunnused. Tüseda tõmpnina puhul võetakse kokkupuute 21. päeval isas- ja emaskalad igale kontsentratsioonile vastavast rühmast (2 isas- ja 4 emaskala igast paralleelnõust, mida on kokku neli) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniini tase ja teisesed sootunnused. Tuleb hinnata kvantitatiivselt sigivust ning sugunäärmed tuleks koos terve organismiga või eraldi fikseerida, et neid saaks vajaduse korral histopatoloogiliselt hinnata.

Katsekontsentratsioonide valimine

24. Käesoleva katsemeetodi puhul peaks suurim katsekontsentratsioon olema maksimaalne talutav kontsentratsioon, mis tehakse kindlaks kontsentratsioonivahemiku leidmise katsega või muude mürgisuse andmete põhjal, 10 mg/l või vees lahustuvuse piirkontsentratsioon, olenevalt sellest, milline neist on väikseim. Uuritava kemikaali maksimaalne talutav kontsentratsioon on suurim kontsentratsioon, mille puhul suremus on väiksem kui 10 %. Sellise lähenemisviisi puhul eeldatakse, et on olemas empiirilised andmed ägeda mürgisuse kohta või muud mürgisuse andmed, mille põhjal saab tuletada maksimaalse talutava kontsentratsiooni. Sellise kontsentratsiooni hindamine võib olla ebatäpne ja nõuab tavaliselt erialateadmisi.

25. Katses tuleb kasutada kolme kontsentratsiooni, mille jada konstantne tegur ei ole suurem kui 10, ning lahjendusveega kontrolli (ja vajaduse korral ka lahustiga kontrolli). Kontsentratsioonide jada teguri puhul soovitatav vahemik on 3,2–10.

KATSE KÄIK

Katsealuste kalade valimine ja kaalumine

26. On tähtis tagada, et kalade kehamassi erinevused katse alguses oleksid minimaalsed. Käesolevas katsemeetodis eri liikide puhul soovitatavad suurusevahemikud on esitatud 2. liites. Katses kasutatavas kalade partiis peaks kõikide isas- ja emaskalade kehamass jääma katse alguses võimaluse korral vahemikku ± 20 % samasooliste kalade massi aritmeetilisest keskmisest. Soovitatav on kaaluda enne katset samast kalade populatsioonist osaproov, et leida hinnanguline keskmine kehamass.

Kokkupuutetingimused

Kestus

27. Katse algab kokkupuute-eelse perioodi lõppemisel ja kestab 21 päeva. Soovitatav kokkupuute-eelne periood on üks kuni kaks nädalat.

Söötmine

28. Kalu tuleks sööta sobiva söödaga (2. liide) *ad libitum* ja piisavalt tihti, et tagada nende organismi hea seisund. Tuleb kanda hoolt mikroobide kasvu ja vee hägustumise ärahoidmise eest. Üldreeglina võib päevaratsiooni jagada

▼M7

kaheks või kolmeks võrdseks osaks ja sööta kalu mitu korda päevas vähemalt kolmetunniste vaheaegadega. Suurem ühekordne söödakogus on samuti lubatav, eelkõige nädalalõpul. Kalu ei tohiks sööta 12 tunni jooksul enne proovivõtmist/lahkamist.

29. Kalasööda kohta peaks olema teada saasteainete, näiteks kloororgaaniliste pestitsiidide, polütsükliliste aromaatsete süsivesinike ja polüklooritud bifenüülide sisaldus. Suure fütoöstrogeenisisaldusega sööta, mis maskeeriks kalade reaktsiooni teadaolevale östrogeeni agonistile (nt 17β-östradiool), ei tohiks kasutada.

30. Sööda ülejäägid ja väljaheited tuleks eemaldada katsenõudest vähemalt kaks korda nädalas, näiteks iga nõu põhja ettevaatliku puhastamisega sifooni abil.

Valgus ja temperatuur

31. Valgustusperiood ja veetemperatuur peaksid olema katseliigile sobivad (vt 2. liide).

Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus

32. Enne kokkupuuteperioodi algust tuleks tagada kemikaali lisamise süsteemi nõuetekohane toimimine. Tuleks kindlaks teha kõik vajalikud analüüsimeetodid, sealhulgas peaks olema piisavalt teavet uuritava kemikaali püsivuse kohta katsesüsteemis. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid korrapäraste ajavahemike järel järgmiselt: lahjendusvee ja kemikaali põhilahuse voolukiirust tuleks katse jooksul kontrollida soovitatavalt iga päev, kuid vähemalt kaks korda nädalas, ja see ei tohiks kogu katse vältel varieeruda rohkem kui 10 %. Uuritava kemikaali tegelik kontsentratsioon soovitatakse määrata kõikides nõudes katse alguses ja seejärel nädalaste vaheaegadega.

33. Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud kogu katse jooksul säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % nominaalsest kontsentratsioonist, võivad tulemused põhineda kas nominaalsetel või mõõdetud väärtustel.

34. Proove võib olla vaja filtrida (nt läbi 0,45 μm suuruste pooridega filtri) või tsentrifuugida. Sellise vajaduse korral tuleks eelistada tsentrifuugimist. Kui uuritav aine ei adsorbeeru filtril, võib siiski olla vastuvõetav ka filtrimine.

35. Katse ajal mõõdetakse lahustunud hapniku sisaldust, temperatuuri ja pH-d kõigis katsenõudes vähemalt kord nädalas. Üldkaredust ja leelisust tuleks mõõta kontrollnõudes ja ühes kemikaali suurima kontsentratsiooniga katsenõus vähemalt kord nädalas. Temperatuuri tuleks soovitatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katsenõus.

Vaatlused

36. Katse käigus või katse lõpus hinnatakse mitut üldist näitajat (nt elulemus) ja bioloogilist näitajat (nt vitellogeniini tase). Sigivust on vaja hinnata kvantitatiivselt iga päev. Allpool on kirjeldatud nende lõppnäitajate mõõtmist ja hindamist ning nende kasulikkust.

Elulemus

37. Kalad tuleks katseperioodi jooksul iga päev üle vaadata; kõik surmajuhtumid tuleks registreerida ja surnud kalad võimalikult kiiresti eemaldada. Surnud kalu ei tohiks asendada ei kontrollnõudes ega ka kemikaaliga nõudes. Katse kestel surnud kalade sugu tuleks määrata sugunäärmete makroskoopilise hindamise teel.

▼M7

Käitumine ja välimus

38. Igasugune ebatavaline käitumine (võrreldes kontrollrühmaga) tuleks registreerida; see võib hõlmata üldise mürgisuse ilminguid, sealhulgas hingeldamist, koordineerimata ujumist, tasakaalu kaotamist ja ebatüüpilist liikumatust või söömist. Lisaks tuleks registreerida välised anomaaliad (näiteks veritsus, värvimuutus). Selliseid mürgisuse nähte tuleks andmete tõlgendamisel hoolikalt kaaluda, kuna need võivad ilmneda kemikaali sellisel kontsentratsioonil, mille juures endokriinse toime biomarkerid ei ole usaldusväärsed. Kõnealune käitumise vaatlemine võib samuti anda kasulikku kvalitatiivset teavet selle kohta, milliseid nõudeid tuleks kaladega tehtavate katsete puhul edaspidi kohaldada. Näiteks on tüseda tõmpnina puhul täheldatud normaalsetel isaskaladel ja maskuliniseerunud emaskaladel androgeense kemikaaliga kokkupuute tagajärjel territooriumiga seotud agressiivsust; vöödilise daanio puhul on tavaline paaritumis- ja kudemiskäitumine koidikul pärast valgeks minemist östrogeense või antiandrogeense kemikaaliga kokkupuute tagajärjel takistatud või ilmneb vähem.

39. Kuna mõned välistunnused (eelkõige värvus) võivad kala käsitsemise käigus kiiresti muutuda, on oluline registreerida kvalitatiivsed tähelepanekud enne kalade katsesüsteemist eemaldamist. Tüseda tõmpninaga saadud seniste kogemuste kohaselt võivad mõned endokriinse toimega kemikaalid esialgu tekitada muutusi järgmistes välistes tunnustes: keha värvus (hele või tume), värvimuster (vertikaalsete vöötide olemasolu) ja kehakuju (pea ja rinnaosa). Seepärast tuleks kogu katse jooksul ja katse lõpus vaadelda kalade füüsilist välimust.

Sigivus

40. Kudemist käsitlevad igapäevased vaatlusandmed tuleks registreerida paralleelrühma tasandil. Marja tootmise andmete puhul tuleks paralleelrühma tasandil registreerida marjaterade arv elus emaskala kohta päevas. Marjaterad eemaldatakse iga päev katsekambrist. Tüseda tõmpnina ja vöödilise daanio puhul tuleks paigutada katsekambrisse kudemissubstraat, et kalad saaksid kudeda tavapärastes tingimustes. Soovitatavaid kudemissubstraate on üksikasjalikumalt kirjeldatud 4. liites (vöödilise daanio puhul 4A liites ja tüseda tõmpnina puhul 4B liites). Jaapani riisikala puhul ei peeta kudemissubstraadi lisamist vajalikuks.

Kalade humaanne surmamine

41. Kalad tuleks 21. päeval, st kemikaaliga kokkupuute lõpetamisel humaanselt surmata vajaliku koguse trikaiiniga (trikaiinmetaansulfonaat, metakaiin, MS-222 (CASi nr 886-86-2), 100–500 mg/l), mis on limaskesta ärrituse vähendamiseks puhverdatud $NaHCO_3$-ga (naatriumvesinikkarbonaat (CASi nr 144-55-8), 300 mg/l); seejärel võetakse vere- või koeproov vitellogeniini määramiseks, nagu on selgitatud jaotises „Vitellogeniin“.

Teiseste sootunnuste vaatlemine

42. Mõned endokriinse toimega kemikaalid võivad põhjustada muutusi spetsiifilistes teisestes sootunnustes (pulmarüü köbrukeste arv isasel tüsedal tõmpninal, papillaarjätkete arv isasel jaapani riisikalal). Teatava toimemehhanismiga kemikaalid võivad põhjustada teiseste sootunnuste ebanormaalset ilmumist vastassoost isenditel; näiteks võivad sellised androgeeniretseptori agonistid nagu trenboloon, metüültestosteroon ja dihüdrotestosteroon põhjustada silmapaistvate pulmarüü köbrukeste tekkimise emasel tüsedal tõmpninal või papillaarjätkete väljaarenemise emasel jaapani riisikalal (11, 20, 21). Samuti on leitud, et östrogeeniretseptori agonistid võivad vähendada täiskasvanud isase tüseda tõmpnina pulmarüü köbrukeste arvu ja turjapadjandi

▼M7

suurust (26, 27). Sellised üldised morfoloogilised vaatlused võivad samuti anda kasulikku kvalitatiivset ja kvantitatiivset teavet selle kohta, milliseid nõudeid tuleks kaladega tehtavate katsete puhul edaspidi järgida. Tüseda tõmpnina pulmarüü kõbrukeste ning jaapani riisikala papillaarjätkete arvu ja suurust saab mõõta kas otse või fikseeritud isenditel; viimane variant on mugavam. Tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala teiseste sootunnuste hindamise soovitatav kord on esitatud vastavalt 5A ja 5B liites.

Vitellogeniin

43. Veri võetakse sabaarterist või -veenist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartoruga või teise võimalusena süstla abil tehtava südamepunktsiooniga. Sõltuvalt kala suurusest on kogutava vere kogus tüseda tõmpnina isendi puhul üldiselt vahemikus 5–60 µl ja vöödilise daanio isendi puhul 5–15 µl. Plasma eraldatakse verest tsentrifuugimisega ja seda hoitakse koos proteaasiinhibiitoritega – 80 °C juures kuni vitellogeniini määramiseni. Teise võimalusena kasutatakse vitellogeniini määramiseks kudede allikana jaapani riisikala maksa või vöödilise daanio pea-saba homogenaati (6. liide). Vitellogeniin tuleks määrata valideeritud homoloogse ELISA meetodiga, kasutades homoloogset vitellogeniini standardit ja homoloogseid antikehi. Soovitatav on kasutada meetodit, millega on võimalik tuvastada vitellogeniini nii väikeses koguses kui mõni nanogramm plasma milliliitri (või koe milligrammi) kohta, mis on taustsisaldus isaskalas, kes ei ole kemikaaliga kokku puutunud.

44. Vitellogeniini määramise kvaliteedi kontrollimiseks kasutatakse standardeid ja negatiivseid kontrolle ning tehakse vähemalt kaks paralleelmõõtmist. Iga ELISA meetodi puhul tuleks teha maatriksiefekti (proovi lahjendamise mõju) hindamise katse, et määrata proovi minimaalne lahjendustegur. Iga ELISA plaat, mida kasutatakse vitellogeniini määramiseks, peaks sisaldama järgmisi kvaliteedikontrolli proove: vähemalt 6 kaliibrimisstandardit, mille kontsentratsioonivahemik hõlmab vitellogeniini kontsentratsiooni eeldatavat vahemikku, ja vähemalt üks negatiivne kontroll mittespetsiifilise seondumise hindamiseks (kaks paralleelproovi). Nende negatiivsete kontrollide puhul peaks neeldumine olema väiksem kui 5 % kaliibrimisstandardi puhul täheldatavast maksimaalsest neeldumisest. Igast proovi lahjendusest analüüsitakse vähemalt kahte alikvooti (paralleelkannudes). Kui tulemused paralleelkannudes erinevad rohkem kui 20 %, tuleks teha kordusanalüüs.

45. Kaliibrimiskõvera korrelatsioonikordaja (R^2) peaks olema suurem kui 0,99. Hea korrelatsioon ei ole siiski piisav, et tagada ennustatavate väärtuste õigsus kõigis kontsentratsioonivahemikes. Lisaks kaliibrimiskõvera piisavalt heale korrelatsioonile peab ka standardi iga kontsentratsioon, mis arvutatakse kaliibrimiskõvera põhjal, jääma vahemikku 70–120 % vastavast nominaalsest kontsentratsioonist. Kui nominaalsed kontsentratsioonid kalduvad kaliibrimise regressioonisirgest eemale (nt madalatel kontsentratsioonidel), võib olla vajalik jagada kaliibrimiskõver madalale ja kõrgele kontsentratsioonile vastavateks osadeks või kasutada neeldumisandmetele lähendamiseks mittelineaarset mudelit, mis neid õigesti kirjeldaks. Kui sirge jagatakse kaheks osaks, peaks kummaski osas olema $R^2 > 0,99$.

46. Avastamispiir on määratletud kui madalaim analüüsistandardi kontsentratsioon ning määramispiir on määratletud kui madalaim analüüsistandardi kontsentratsioon, mis on korrutatud väikseima lahjendusteguriga.

47. Igal vitellogeniini määramise päeval analüüsitakse ka rikastatud proovi, mis on valmistatud eri katsetes kasutatava võrdlusstandardiga (7. liide). Selle standardi eeldatava kontsentratsiooni ja mõõdetud kontsentratsiooni suhtarv esitatakse koos samal päeval tehtud määramiste tulemustega.

Sugunäärmete histopatoloogiline hindamine

48. Reguleerivad asutused võivad nõuda sugunäärmete kui hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete teljel paikneva sihtorgani histopatoloogilist hindamist pärast kokkupuudet kemikaaliga. Sel põhjusel fikseeritakse sugunäärmed koos terve organismiga või eraldi. Kui histopatoloogiline analüüs on nõutav, vaadeldakse uuritava kemikaali endokriinse toime hindamisel spetsiifilist endokriinsüsteemiga seotud mõju sugunäärmetele. Kõnealuste diagnostiliste näitajatena tuleb muu hulgas hinnata munarakkude esinemist seemnesarjas,

▼M7

Leydigi rakkude hüperplaasiat, rebutootmise vähenemist, spermatogoonide arvu suurenemist ja perifollikulaarset hüperplaasiat. Muudel sugunäärmete kahjustustel, näiteks munarakkude atreesial, seemnesarja taandarengul ja sugurakkude arenguga seotud muutustel võib olla mitu tekkepõhjust. Kalade sugunäärmete histopatoloogilist analüüsi käsitlevas juhenddokumendis on sätestatud kord, mida tuleb järgida sugunäärmete eraldamisel, fikseerimisel, koelõikude valmistamisel ja histopatoloogilisel hindamisel (22).

ANDMED JA ARUANDLUS

Biomarkerite põhjal mõju hindamine dispersioonanalüüsiga

49. Kemikaali võimaliku endokriinse toime tuvastamiseks võrreldakse kemikaaliga rühmades saadud näitajaid kontrollrühmade vastavate näitajatega; selleks kasutatakse dispersioonanalüüsi. Lahustiga kontrolli kasutamise korral tuleks iga lõppnäitaja puhul teha asjakohane statistiline test lahjendusveega kontrolli ja lahustiga kontrolli võrdlemiseks. Juhised lahjendusveega kontrolli ja lahustiga kontrolli andmete kasutamise kohta edasises statistilises analüüsis on esitatud viites OECD (2006c) (28). Kõikide bioloogiliste näitajate andmeid tuleks analüüsida ja need esitada kummagi soo puhul eraldi. Kui parameetriliste meetodite vajalikud eeldused ei ole täidetud – tegemist on normaaljaotusest erineva jaotusega (nt Shapiro-Wilki test) või heterogeense hajuvusega (Bartletti test või Levene'i test) –, tuleks kaaluda andmete teisendamist, et muuta hajuvus enne dispersioonanalüüsi tegemist homogeenseks, või kaalutud dispersioonanalüüsi kasutamist. Kui toime sõltuvus kontsentratsioonist ei ole monotoonne, võib kasutada Dunnetti testi (parameetriline) mitmeseks paariviisiliseks võrdlemiseks või Manni-Whitney testi Bonferroni parandusega (mitteparameetriline). Kui toime sõltuvus kontsentratsioonist on ligikaudu monotoonne, võib kasutada muid statistilisi teste (nt Jonckheere'i-Terpstra või Williamsi test). Sobivaima statistilise testi leidmist hõlbustav statistilise analüüsi valimise vooskeem on esitatud 8. liites. Täiendav teave on kättesaadav ka OECD dokumendis, milles käsitletakse praegusi meetodeid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks (28).

Katsetulemuste esitamine

50. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist.

Uurimislabor:

— vastutavad töötajad ja nende kohustused uuringus;

— iga labori pädevus peaks olema mitmesuguste representatiivsete kemikaalide kasutamise kaudu tõendatud.

Uuritav kemikaal:

— uuritava kemikaali iseloomustus;

— füüsikalised ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— katses kasutatud kontsentratsiooniga lahuste valmistamise meetod ja sagedus;

— teave püsivuse ja biolagundatavuse kohta.

Lahusti:

— lahusti iseloomustus (kirjeldus, kasutatud kontsentratsioon);

— lahusti valimise põhjendus (kui see on muu kui vesi).

▼**M7**

Katseloomad:

— liik ja liin;

— tarnija ja tema konkreetne käitis;

— kalade vanus katse alguses ja nende paljunemisvõime/kudemisseisund;

— kalade kohandamise meetodi üksikasjad;

— kalade kehamass kemikaaliga kokkupuute alguses (kalaparvest võetud osaproovi põhjal).

Katsetingimused:

— kasutatud katsemeetod (katse tüüp, biomassisisaldus, asustustihedus jne);

— põhilahuse valmistamise meetod ja voolukiirus;

— nominaalsed katsekontsentratsioonid, igal nädalal mõõdetud katselahuste kontsentratsioonid ja kasutatud analüüsimeetod, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali sisaldust tõelises lahuses;

— lahjendusvee omadused (pH, karedus, leelisus, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, kloorijääkide sisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus, hõljuvaine sisaldus ja kõik muud mõõdetud näitajad);

— vee kvaliteet katsenõudes: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku sisaldus;

— üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus ning asjakohaste saasteainete (nt polüklooritud bifenüülid, polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud ja klooorgaanilised pestitsiidid) määramise korral sellise analüüsi tulemused).

Tulemused:

— tõendid selle kohta, et kontrollid vastasid nõuetekohasuse kriteeriumidele;

— andmed suremuse kohta iga katsekontsentratsiooni ja kontrolli puhul;

— kasutatud statistilise analüüsi meetodid, teave andmete töötlemise kohta ja selleks kasutatud meetodite valimise põhjendus;

— bioloogiliste vaatluste andmed üldiste morfoloogiliste muutuste, sealhulgas teiseste sootunnuste kohta, samuti marja tootmise ja vitellogeniini kohta;

— andmete analüüsi tulemused, soovitatavalt tabelite ja graafikute kujul;

— kalade ebatavaliste reaktsioonide esinemissagedus ja kõik uuritava kemikaali põhjustatud nähtavad ilmingud.

▼M7

KATSETULEMUSTE TÕLGENDAMISE JA KEHTIVAKS TUNNISTAMISE JUHISED

51. Käesolevas jaotises on esitatud mõned kaalutlused, mida tuleb arvesse võtta katses mõõdetavate eri lõppnäitajate puhul saadud tulemuste tõlgendamisel. Kui uuritav kemikaal näib põhjustavat ilmset mürgistust või mõjutavat katseloomade üldist seisundit, tuleks tulemuste tõlgendamisel olla ettevaatlik.

52. Katsekontsentratsioonide vahemiku valimisel tuleks jälgida, et ei ületataks maksimaalset talutavat kontsentratsiooni; vastasel juhul ei ole võimalik andmeid mõistlikult tõlgendada. On oluline, et vähemalt ühe kontsentratsiooni juures ei täheldataks mingeid mürgisuse nähte. Haiguse ja mürgise toime ilminguid tuleks põhjalikult hinnata ja esitada need katseprotokollis. Näiteks on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus, näiteks hepatotoksilisus. Mõju tõlgendamist võivad hõlbustada sellistel kontsentratsioonidel saadud andmed, mille juures tulemusi ei moonuta süsteemne mürgisus.

53. Katsetulemuste kehtivaks tunnistamisel tuleb arvesse võtta mitut aspekti. Tuleks juhinduda sellest, et vitellogeniini tase kontrollrühmades peaks isas- ja emaskaladel olema erinev ning see erinevus peaks olema tüseda tõmpnina ja vöödilise daanio puhul umbes kolm suurusjärku ning jaapani riisikala puhul umbes üks suurusjärk. Näited kontrollrühmades ja uuritava kemikaaliga rühmades saadud väärtuste vahemiku kohta on esitatud valideerimisaruannetes (1–4). Kõrge vitellogeniinitase kontrollrühma isaskaladel võib negatiivselt mõjutada meetodi tundlikkust ja nõrkade östrogeeni agonistide tuvastamise võimet. Madal vitellogeniinitase kontrollrühma emaskaladel võib negatiivselt mõjutada meetodi tundlikkust ning aromataasi inhibiitorite ja östrogeeni antagonistide tuvastamise võimet. Kõnealuseid valideerimisuuringuid kasutati käesolevate juhiste väljatöötamiseks.

54. Marja tootmise kvantitatiivse hindamise puhul tuleb silmas pidada, et see varieerub suurel määral (vastav variatsioonikordaja võib olla 20–60 %); see piirab võimalust tuvastada katses marja tootmise olulist vähenemist, kui see jääb alla 70 % ja variatsioonikordaja on ligi 50 % või suurem. Kui variatsioonikordaja väärtus on väiksem (umbes 20–30 %), on meetodi võimsus piisav (80 %), et tuvastada marja tootmise vähenemine 40–50 % võrra. Tüseda tõmpnina puhul kasutatav katseplaan, millega nähakse muu hulgas ette neli paralleeli iga kontsentratsiooni kohta, peaks võimaldama määrata kõnealuse sigivust iseloomustava lõppnäitaja suurema võimsusega kui üksnes kahe paralleeliga katseplaan.

55. Kui laboris ei ole asjaomast katset varem läbi viidud või seal on tehtud olulisi muudatusi (nt on muutunud kalade liin või tarnija), on soovitatav teha tehnilise pädevuse katse. Soovitatavalt tuleks kasutada kemikaale, mille puhul täheldatakse kõigi kemikaalide lõikes rida eri toimemehhanisme või mõju mitmele katses kasutatavale lõppnäitajale. Praktikas kutsutakse iga laborit üles looma varasemate kontrollrühmi käsitlevate andmete põhjal oma andmestikku isas- ja emaskalade kohta ning tegema positiivse kontrolli katse östrogeense toimega kemikaaliga (nt 17β-östradiool kontsentratsioonis 100 ng/l või mõni teadaolev nõrk agonist), mille mõjul tõuseb vitellogeniini tase isaskalades, positiivse kontrolli katse aromataasi pärssiva kemikaaliga (nt fadrosool või prokloraas kontsentratsioonis 300 µg/l), mille toimel väheneb vitellogeniinisisaldus emaskalades, ning positiivse kontrolli katse androgeense toimega kemikaaliga (nt 17β-trenboloon kontsentratsioonis 5 µg/l), mis põhjustab emastel tüsedatel tõmpninadel ja jaapani riisikaladel isaskalade teiseste sootunnuste ilmumist. Labori pädevuses veendumiseks võib kõiki neid andmeid võrrelda valideerimisuuringute (1–3) kättesaadavate andmetega.

56. Üldiselt tuleks vitellogeniini määramise tulemused lugeda positiivseks, kui vähemalt suurimal katses kasutatud kontsentratsioonil tuvastatakse kontrollrühmaga võrreldes vitellogeniinitaseme statistiliselt oluline ($p < 0,05$) tõus isaskalades või statistiliselt oluline ($p < 0,05$) langus emaskalades, kui samas

▼M7

ei ilmne üldise mürgisuse nähte. Positiivset tulemust toetab täiendavalt kontsentratsiooni ja toime vahelise bioloogiliselt usutava sõltuvuse tuvastamine. Nagu eespool märgitud, ei pruugi vitellogeniinisisalduse vähenemine olla tingitud üksnes endokriinsest toimest, kuid positiivset tulemust tuleks üldjuhul tõlgendada tõendina endokriinse toime kohta *in vivo* ja sellist toimet tuleks selguse saamiseks tavaliselt täiendavalt uurida.

57. Reguleerivad asutused võivad nõuda sugunäärmete histopatoloogilist hindamist, mis võimaldab teha kindlaks katseloomade paljunemisvõime ja hinnata katsetulemuste kaalukust. Sugunäärmete histopatoloogiline analüüs ei pruugi olla vajalik juhul, kui vitellogeniini või teiseste sootunnuste määramise tulemused on positiivsed (st täheldatakse vitellogeniinisisalduse suurenemist või vähenemist või vastassoo teiseste sootunnuste ilmumist).

KIRJANDUS

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances (Phase 1A). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 60. Pariis.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances (Phase 1B). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 61. Pariis.

(3) OECD (2007). Final Report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 78. Pariis.

(4) Owens, J. W. (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. Endokriinset toimet käsitlev CEFIC LRI projekt. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (vaadatud 18.9.2008).

(5) USA Keskkonnakaitseamet (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15. detsember 2007. USA Keskkonnakaitseamet, Washington, D. C. 104 lk.

(6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 94. Pariis.

(7) Sumpter, J. P., ja Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Persp.* 103, Suppl. 7: 173–178 (ülevaateartikkel).

(8) Pawlowski, S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17α-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquat. Toxicol.* 68 (3): 277–291.

(9) Andersen, L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 76 (3–4): 343–352.

(10) Ankley, G. T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 67 (1): 121–130.

▼M7

(11) Panter, G. H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquat. Toxicol.* 70 (1): 11–21.

(12) Parks, L. G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comp. Biochem. Phys. C* 123 (2): 113–125.

(13) Panter, G. H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG uuringuaruanne AQ001. CEFIC, Brüssel, Belgia.

(14) Fenske, M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217–232.

(15) Holbech, H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Phys. C* 130: 119–131.

(16) Rose, J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531–539.

(17) Brion, F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 1699–1708.

(18) Yokota, H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn. J. Environ. Toxicol.* 4: 87–98.

(19) Tatarazako, N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *J. Health Sci.* 50: 301–308.

(20) Ankley, G. T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17β-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (6): 1350–1360.

(21) Seki, M., *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (3): 774–781.

(22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 123. Pariis.

(23) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Pariis.

(24) Hutchinson, T. H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquat. Toxicol.* 76: 69–92.

(25) Hutchinson, T. H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish – biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. *Environ. Health Persp.* 114, Suppl. 1: 106–114.

▼**M7**

(26) Miles-Richardson, S. R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47: 129–145.

(27) Martinovic, D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 478–488.

(28) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariis.

(29) USA Keskkonnakaitseamet (2008). Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay. 30. jaanuar 2008. USA Keskkonnakaitseamet, Washington, D. C. 110 lk.

(30) OECD (2012). OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150. OECD, Pariis.

▼**M7**

1. liide

LÜHENDID JA MÕISTED

Kemikaal – aine või segu.

ELISA – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs.

Biomassisisaldus – kalade märgmass vee ruumalaühiku kohta.

Maksimaalne talutav kontsentratsioon – kontsentratsioon, mis on ligikaudu 10 % LC_{50} väärtusest.

Asustustihedus – kalade arv vee ruumalaühiku kohta.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Vitellogeniin – fosfolipoglükoproteiin, mis on munarebu valkude eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikide ovipaarsete liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

▼M7

2. liide

KALADE ENDOKRIINSÜSTEEMI MÕJUTAVATE KEMIKAALIDE SÕELUURINGU TINGIMUSED

1. Soovitatav liik	Tüse tömpnina (*Pimephales promelas*)	Jaapani riisikala (*Oryzias latipes*)	Vöödiline daanio (*Danio rerio*)
2. Katse tüüp	Läbivoolukatse	Läbivoolukatse	Läbivoolukatse
3. Vee temperatuur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)
5. Valgustihedus	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)
6. Valgustusperiood (koidu/hämariku üleminekuid võib korraldada, kuid neid ei peeta vajalikuks)	16 tundi valgust, 8 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 12–8 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 12–8 tundi pimedust
7. Biomassisisaldus	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Katsekambri suurus	10 l (miinimum)	2 l (miinimum)	5 l (miinimum)
9. Katselahuse ruumala	8 l (miinimum)	1,5 l (miinimum)	4 l (miinimum)
10. Katselahuse uuendamine kogu ruumala ulatuses	Vähemalt 6 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas
11. Katseloomade vanus	Vt punkt 21	Vt punkt 21	Vt punkt 21
12. Täiskasvanud kala ligikaudne märgmass (g)	Emased: 1,5 ± 20 % Isased: 2,5 ± 20 %	Emased: 0,35 ± 20 % Isased: 0,35 ± 20 %	Emased: 0,65 ± 20 % Isased: 0,4 ± 20 %
13. Kalade arv katsenõu kohta	6 (2 isaskala ja 4 emaskala)	6 (3 isaskala ja 3 emaskala)	10 (5 isaskala ja 5 emaskala)
14. Kontsentratsioonipunktide arv	= 3 (pluss vajalikud kontrollid)	= 3 (pluss vajalikud kontrollid)	= 3 (pluss vajalikud kontrollid)
15. Nõude arv kontsentratsioonipunkti kohta	Vähemalt 4	Vähemalt 4	Vähemalt 2
16. Kalade arv katsekontsentratsiooni kohta	16 täiskasvanud emast ja 8 isast (4 emast ja 2 isast igas paralleelnõus)	12 täiskasvanud emast ja 12 isast (3 emast ja 3 isast igas paralleelnõus)	10 täiskasvanud emast ja 10 isast (5 emast ja 5 isast igas paralleelnõus)
17. Söötmisrežiim	Elus või külmutatud soolase vee krevettide täiskasvanud või noorjärgus isendid 2–3 korda päevas (*ad libitum*), müügilolev kalasööt või nende kombinatsioon	Soolase vee krevettide noorjärgus isendid 2–3 korda päevas (*ad libitum*), müügilolev kalasööt või nende kombinatsioon	Soolase vee krevettide noorjärgus isendid 2–3 korda päevas (*ad libitum*), müügilolev kalasööt või nende kombinatsioon

▼M7

18. Aereerimine	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist
19. Lahjendusvesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekloritud kraanivesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekloritud kraanivesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekloritud kraanivesi
20. Kokkupuute-eelne periood	Soovitatavalt 7–14 päeva	Soovitatavalt 7–14 päeva	Soovitatavalt 7–14 päeva
21. Kemikaaliga kokkupuute kestus	21 päeva	21 päeva	21 päeva
22. Bioloogilised lõppnäitajad	— Elulemus — Käitumine — Sigivus — Teisesed sootunnused — Vitellogeniin — Vajaduse korral sugunäärmete histopatoloogiline hinnang	— Elulemus — Käitumine — Sigivus — Teisesed sootunnused — Vitellogeniin — Vajaduse korral sugunäärmete histopatoloogiline hinnang	— Elulemus — Käitumine — Sigivus — Vitellogeniin — Vajaduse korral sugunäärmete histopatoloogiline hinnang
23. Katse nõuetekohasus	Lahustunud hapniku sisaldus > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur 25 ± 2 °C; kalade elulemus kontrollrühma(de)s vähemalt 90 %; mõõdetud katsekontsentratsioonid vahemikus ± 20 % mõõtmistulemuste keskväärtusest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapniku sisaldus > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur 25 ± 2 °C; kalade elulemus kontrollrühma(de)s vähemalt 90 %; mõõdetud katsekontsentratsioonid vahemikus ± 20 % mõõtmistulemuste keskväärtusest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapniku sisaldus > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur 26 ± 2 °C; kalade elulemus kontrollrühma(de)s vähemalt 90 %; mõõdetud katsekontsentratsioonid vahemikus ± 20 % mõõtmistulemuste keskväärtusest igal kontsentratsioonil

▼**M7**

3. liide

MÕNED LAHJENDUSVEE NÕUTAVAD KEEMILISED OMADUSED

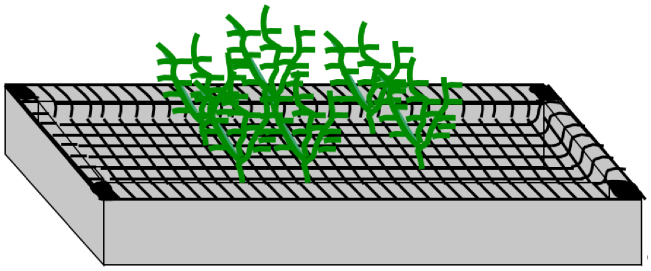
KOOSTISOSA	KONTSENTRATSIOON
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Kloorijäägid	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

▼M7

4A liide

VÖÖDILISE DAANIO KUDEMISSUBSTRAAT

Kudemisalus: üleni klaasist instrumendinõu, näiteks mõõtmetega 22 × 15 × 5,5 cm (pikkus × laius × sügavus), mis on kaetud eemaldatava roostevabast terastraadist võrega (võresilma suurus 2 mm). Võre peaks katma instrumendinõu valendiku allpool nõu äärt.



Võre peale tuleks kinnitada kudemissubstraat. Selle struktuur peaks olema selline, et kalad saavad substraati siseneda. Sobivad näiteks rohelisest plastmaterjalist kunstlikud akvaariumitaimed (NB: tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali võimalikku adsorbeerumist plastmaterjalile). Plastmaterjali tuleb leostada piisava koguse sooja veega piisavalt kaua, et hoida ära kemikaalide leostumine vette katse ajal. Klaasmaterjali kasutamisel tuleks tagada, et kalad ei saaks vigastusi ega peaks oma aktiivse tegevuse käigus taluma ruumikitsikust.

Vahemaa aluse ja kambri klaasseinte vahel peaks olema vähemalt 3 cm, et kudemist ei toimuks väljaspool alust. Alusele koetud marjaterad langevad läbi võre ja need võib koguda 45–60 minutit pärast valgustuse sisselülitamist. Läbipaistvad marjaterad ei ole kleepuvad ja on külgvalguses kergesti loendatavad. Kui ühe nõu kohta kasutatakse viit emaskala, võib marjaterade arvu kuni 20 ühe päeva kohta pidada väikeseks, kuni 100 – keskmiseks ja üle 100 – rikkalikuks saagiseks. Kudemisalus tuleks eemaldada, marjaterad kokku koguda ja kudemisalus uuesti katsenõusse tagasi panna kas võimalikult hilja õhtul või väga vara hommikul. Aeg kudemisaluse tagasipanekuni ei tohiks olla pikem kui üks tund, sest vastasel juhul võib kudemissubstraadi ilmumine mõjutada kalu ebatavalisel ajal individuaalselt paarituma ja kudema. Kui olukord tingib kudemisaluse hilisema tagasipaneku, tuleks seda teha vähemalt 9 tundi pärast valgustuse sisselülitamist. Sellisel hilisel kellaajal kudemist enam ei toimu.

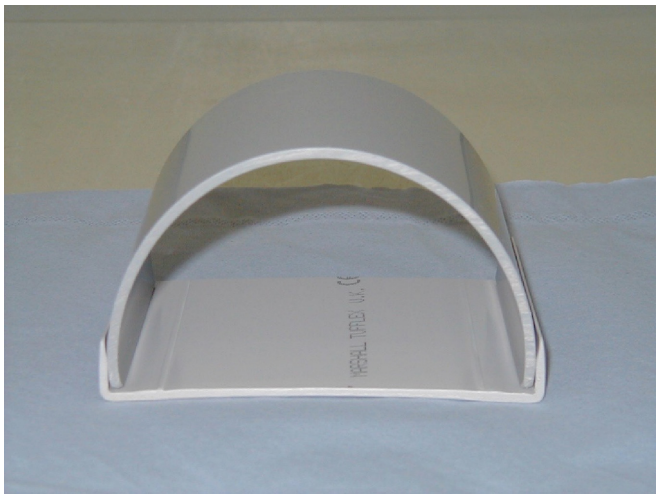
▼M7

4B liide

TÜSEDA TÖMPNINA KUDEMISSUBSTRAAT

Igasse katsekambrisse pannakse kaks või kolm plastist, klaasist, roostevabast terasest või keraamilist kudemisvõlvi ja alust (nt 80 mm pikkune hall poolkaarekujulise ristlõikega vihmaveerenni jupp, mis asub 130 mm pikkusel servadega alusel) (vt joonis). Korralikult vanandatud polüvinüülkloriidist või keraamilised võlvid on tõendatult sobiv kudemissubstraat (Thorpe *et al.*, 2007).

Võlvid on soovitatav nakkuvuse parandamiseks karestada. Alus tuleks ühtlasi varustada kaitsevõrega, et takistada kalade juurdepääsu koetud marjale, välja arvatud juhul, kui marjaterade tõhus nakkuvus kasutatava kudemissubstraadiga on tõendatud.



Aluse ülesanne on pidada kinni kõik marjaterad, mis ei nakku kudemisvõlvi pinnaga ja kukuksid aluse puudumisel kambri põhja, samuti marjaterad, mis on koetud otse lamedale plastalusele. Kõiki kudemissubstraate tuleks enne kasutamist vähemalt 12 tundi lahjendusveega leostada.

Thorpe, K. L., Benstead, R., Hutchinson, T. H., ja Tyler, C. R. (2007). An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas. Aquat. Toxicol.* 81: 90–98.

▼M7

5A liide

TÜSEDA TÖMPNINA TEISESTE SOOTUNNUSTE HINDAMINE ENDOKRIINSE TOIMEGA KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS

Ülevaade

Täiskasvanud tüseda tõmpnina välistunnused, mis võivad olla endokriinse toimega kemikaalide tuvastamiseks olulised, hõlmavad järgmist: värvus (st hele/-tume), värvimuster (st vertikaalsete vöötide olemasolu või puudumine), kehakuju (st pea ja rinnaosa kuju, kõhu laienemine) ja spetsiifilised teisesed sootunnused (st pulmarüü köbrukeste arv ja suurus, turjapadjandi ja muneti suurus).

Pulmarüü köbrukesed asuvad tüseda tõmpnina suguliselt aktiivse isaskala pea peal (turjapadjandil) ja paiknevad tavaliselt bilateraalsümmeetriliselt (Jensen *et al.*, 2001). Kontrollrühma emaskaladel ning noortel isas- ja emaskaladel köbrukesi ei ole (Jensen *et al.*, 2001). Isaskala silmade ümber ja sõõrmete vahel võib olla kuni kaheksa eraldi köbrukest. Suurim arv köbrukesi ja suurimad köbrukesed asuvad kahel paralleelsel joonel vahetult sõõrmete all ja suu kohal. Paljudel kaladel esinevad köbrukeste rühmad alalõua all; suule kõige lähemaid köbrukesi on tavaliselt üks paar, kõhupoolsemas rühmas võib neid aga olla kuni neli. Köbrukeste tegelik arv on harva suurem kui 30 (vahemik 18–28; Jensen *et al*., 2001). Suurem osa köbrukesi kujutab endast võrdlemisi ümmargust eraldi moodustist, mille kõrgus on ligikaudu võrdne selle raadiusega. Enamikul suguliselt aktiivsetel isaskaladel on vähemalt mõned köbrukesed sedavõrd suurenenud ja silmapaistvad, et neid ei ole võimalik eraldiseisvana eristada.

Endokriinsüsteemi mõjutavate kemikaalide hulgas võivad teatavat liiki kemikaalid põhjustada teatavate vastassoo teiseste sootunnuste ebanormaalse ilmumise. Näiteks võivad sellised androgeeniretseptori agonistid nagu 17α-metüültestosteroon ja 17β-trenboloon põhjustada emasel tüsedal tõmpninal pulmarüü köbrukeste ilmumise (Smith, 1974; Ankley *et al.*, 2001, 2003), samal ajal kui östrogeeniretseptori agonistid võivad vähendada isaskaladel pulmarüü köbrukeste arvu või suurust (Miles-Richardson *et al.*, 1999; Harries *et al*., 2000).

Allpool on esitatud tüseda tõmpnina pulmarüü köbrukeste kirjeldamise meetod, mida kasutatakse Minnesota osariigis Duluthis asuvas USA Keskkonnakaitseameti laboris. Konkreetsed tooted ja/või seadmed võib asendada võrreldavate kättesaadavate materjalidega.

Köbrukesi on kõige parem vaadelda valgustusega suurendusklaasi või valgustusega (3X) anatoomilise mikroskoobiga. Kala vaadeldakse selja poolt ja esiotsast (peaga vaatleja poole).

— Kala pannakse väikesele Petri tassile (läbimõõduga nt 100 mm) esiotsaga vaatleja poole ja kõhuga allapoole. Suurendusklaasi või objektiivi fookus seatakse nii, et oleks võimalik vaadelda köbrukesi. Kala pööratakse ettevaatlikult ja aeglaselt küljelt küljele, et tuvastada köbrukeste piirkonnad. Köbrukesed loendatakse ja neid hinnatakse.

— Vaatlust korratakse pea kõhupoolel; selleks pannakse kala Petri tassil selili esiotsaga vaatleja poole.

— Iga kala vaatlus tuleks viia lõpule kahe minutiga.

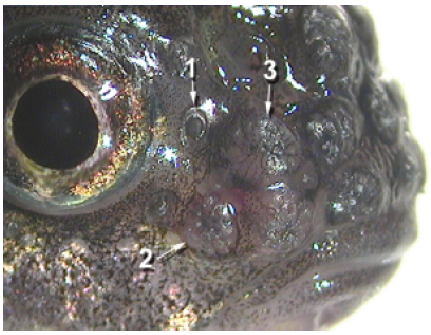
▼M7

Köbrukeste arv ja hindamine

Täiskasvanud tüseda tõmpnina köbrukeste olemasolu ja suuruse hindamiseks on määratletud kuus konkreetset piirkonda. Olemasolevate köbrukeste asukoha ja arvu kaardistamiseks on välja töötatud vorm (vt käesoleva liite lõpus). Registreeritakse iga kala köbrukeste arv ja hinnatakse kvantitatiivselt nende suurust järgmiselt: 0 – puudub, 1– olemas, 2 – suurenenud ja 3 – silmapaistev (joonis 1).

0 punkti – köbruke puudub. 1 punkt – köbruke on olemas ja sellel on üks kõrgeim tipp, mille kõrgus on ligikaudu võrdne köbrukese raadiusega. 2 punkti – suurenenud köbruke, mille kude meenutab kujult tärni ja millel on tavaliselt lai alus keskelt algavate radiaalsete vagudega. Köbrukese tipp on sageli ebakorrapärasem, kuid võib vahel olla veidi ümardunud. 3 punkti – silmapaistev köbruke, tavaliselt üsna suur ja ümmargune, ebaselgema struktuuriga. Sellised köbrukesed on mõnikord kokku kasvanud ja moodustavad ühtse massi, mis paikneb ühel või mitmel köbrukeste alal (allpool kirjeldatud piirkonnad B, C ja D). Värvus ja muster on sarnased 2 punktile vastava köbrukese omaga, kuid on mõnikord raskesti eristatavad. Selle hindamissüsteemi kasutamise korral on normaalsel kontrollrühma isasel, kelle köbrukeste arv on 18–20, köbrukeste punktide üldsumma tavaliselt < 50 (Jensen *et al.*, 2001).

Joonis 1



Tegelik köbrukeste arv võib mõnel kalal olla suurem, kui on vormil asjaomases hindamispiirkonnas lahtreid. Sellisel juhul võib täiendavad hinded märkida lahtri sisse või lahtrist paremale või vasakule. Vormi täitmisel ei pea seega järgima sümmeetriat. Selliste köbrukeste kaardistamiseks, mis paiknevad piki suu horisontaaltasapinda vertikaalselt paaris või ühendatuna, võib kummagi köbrukese hinde märkida samasse lahtrisse.

Kaardistamispiirkonnad

A – silmade ümber paiknevad köbrukesed. Kaardistatakse selja poolt kõhu poole piki silma eesmist äärt. Tavaliselt on kontrollrühma isaskaladel neid mitu, kontrollrühma emaskaladel need puuduvad; androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel esinevad need üldjuhul paaris (üks kummagi silma juures) või ka üksikult.

B-sõõrmete (haistmiselundi avade) vahel paiknevad köbrukesed. Kontrollrühma isaskaladel esinevad need tavaliselt paaris ja on rohkem välja arenenud (2 – suurenenud või 3 – silmapaistvad). Kontrollrühma emaskaladel need puuduvad; androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel võib neid esineda ja need võivad olla teataval määral arenenud.

C – sõõrmetest vahetult eespool suuga paralleelselt paiknevad köbrukesed. Kontrollrühma suguküpsetel isaskaladel on need tavaliselt suurenenud või silmapaistvad. Vähem arenenud isaskaladel ja androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel on need olemas või suurenenud.

▼M7

D – köbrukesed, mis paiknevad paralleelselt piki suujoont. Kontrollrühma isaskaladel hinnatakse need üldjuhul väljaarenenuks. Kontrollrühma emaskaladel need puuduvad, kuid androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel on need olemas.

E – alalõual suu kõrval paiknevad köbrukesed, tavaliselt väikesed ja paarikaupa. Kontrollrühma isaskaladel ning kemikaaliga kokku puutunud isaskaladel ja emaskaladel võivad need olla mitmesugused.

F – köbrukesed, mis paiknevad piirkonnast E kõhu pool. Tavaliselt väikesed ja paaris. Need on olemas kontrollrühma isaskaladel ja androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel.

VIITED

(1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, M. E. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem*. 20: 1276–1290.

(2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C., ja Gray, E. L. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17β-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem*. 22: 1350–1360.

(3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A., Maddix, S., Sumpter, J. P., ja Tyler, C. R. (2000). Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol*. 34: 3003–3011.

(4) Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S., ja Ankley, G. T. (2001). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 128: 127–141.

(5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J., ja Ankley, G. T. (2001). Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J. Fish Biol.* 59: 515–523.

(6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., ja Giesy, J. P. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47: 129–145.

(7) Smith, R. J. F. (1974). Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can. J. Zool.* 52: 1031–1038.

Köbrukeste hindamise vorm

Identimistunnus _____

Kuupäev _____

Üldsumma _____

Numbriline hinnang

1 – olemas

2 – suurenenud

3 – silmapaistev

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

5B liide

JAAPANI RIISIKALA TEISESTE SOOTUNNUSTE HINDAMINE ENDOKRIINSE TOIMEGA KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS

Allpool on kirjeldatud papillaarjätkete ([1]) mõõtmist; nimetatud jätked on jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) teisesed sootunnused.

1) Pärast maksa väljalõikamist (6. liide) pannakse rümp (pea ülespoole, saba allapoole) koonilisse katseklaasi, mis sisaldab umbes 10 ml neutraalset puhverdatud 10 % formaliinilahust. Kui sugunäärmed fikseeritakse muu lahusega kui neutraalne puhverdatud 10 % formaliinilahus, tehakse pärakuuime eesosa ja päraku vahelt žiletiteraga ristilõige läbi rümba; seejuures jälgitakse, et suguava ja sugunäärmed ise ei saaks viga (joonis 3). Kala keha peapoolne osa pannakse sugunäärmete fikseerimiseks fikseerimislahusesse ja sabapoolne osa neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse, nagu on kirjeldatud eespool.

2) Pärast seda, kui kala keha on pandud neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse, võetakse pärakuuime eesosast pintsettidega kinni ja tõmmatakse seda umbes 30 sekundit, et pärakuuime lahti hoida. Pärakuuimest kinnivõtmisel võetakse pintsettide vahele mõned uimekiired uime eesosas ja jälgitakse, et papillaarjätked ei saaks kriimustada.

3) Pärast seda, kui pärakuuime on umbes 30 sekundit lahti hoitud, säilitatakse kala keha kuni papillaarjätkete mõõtmiseni neutraalses puhverdatud 10 % formaliinilahuses toatemperatuuril (jätkeid tuleks mõõta pärast vähemalt 24 tunni pikkust fikseerimist).

Mõõtmine

1) Pärast kala keha fikseerimist neutraalses puhverdatud 10 % formaliinilahuses vähemalt 24 tundi võetakse kala rümp koonilisest katseklaasist välja ja pühitakse formaliin filterpaberisse (või paberrätikusse).

2) Kala asetatakse kõhuga ülespoole. Seejärel lõigatakse väikeste lahkamiskääridega pärakuuim ettevaatlikult ära (parem on lõigata uim ära koos väikese koguse seda toestava koega).

3) Äralõigatud pärakuuime eesosast võetakse pintsettidega kinni ja see pannakse alusklaasile, millel on mõni tilk vett. Seejärel kaetakse pärakuuim katteklaasiga. Tuleb olla ettevaatlik, et pintsettidega pärakuuimest kinni võtmisel ei saaks papillaarjätked kriimustada.

4) Bioloogilise mikroskoobi (tavaline või invertmikroskoop) ja loenduri abil loendatakse papillaarjätketega kiirelülide arv. Papillaarjätketeks loetakse väikest rühma jätkeid kiirelüli tagumisel serval. Iga uimekiire papillaarjätketega lülide arv kirjutatakse töölehele (nt esimene uimekiir: 0, teine uimekiir:

([1]) Papillaarjätked esinevad tavaliselt ainult täiskasvanud isaskaladel ja paiknevad pärakuuime tagumisest otsast lugedes teisel kuni seitsmendal või kaheksandal uimekiirel (joonised 1 ja 2). Mõnikord harva esineb selliseid jätkeid siiski ka pärakuuime tagumisest otsast lugedes esimesel uimekiirel. Käesolev standardne töökord hõlmab jätkete mõõtmist ka esimesel uimekiirel (käesoleva töökorra puhul saadakse uimekiire järjekorranumber pärakuuime tagumisest otsast loendades).

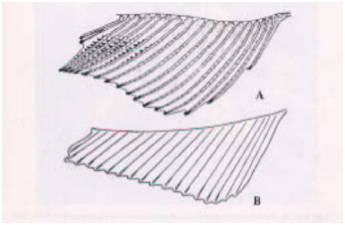
▼M7

10, kolmas uimekiir: 12 jne) ning nende arvude summa iga kala kohta sisestatakse Exceli tabelisse. Vajaduse korral tehakse pärakuuimest pilt ja loendatakse papillaarjätketega kiirelülide arv fotolt.

5) Pärast mõõtmist pannakse pärakuuim punktis 1 kirjeldatud koonilisse katseklaasi ja hoitakse see alles.

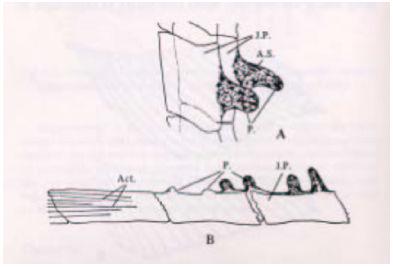
Joonis 1.

Pärakuuime kuju ja suuruse soolised erinevused. A. Isaskala. B. Emaskala. Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Univ. Tokyo, IV, 2: 209–218.



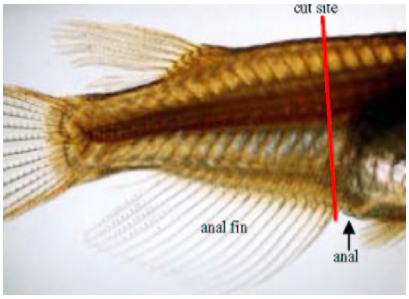
Joonis 2. A.

Jätked pärakuuime kiire lülidel. J. P. (*joint plate*) – kiirelüli; A. S. (*axial space*) – telgedevaheline ruum; P. (*process*) – jätke. B. Uimekiire distaalne ots. Otsas paiknevad aktinotrihhiumid (Act.). Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Univ. Tokyo, IV, 2: 209–218.



Joonis 3.

Foto kala kehast, millel on näidatud lõikamiskoht, kui sugunäärmed fikseeritakse muus lahuses kui neutraalne puhverdatud 10 % formaliinilahus. Sellisel juhul lõigatakse keha pärakuuime eesosa ja päraku vahelt žiletiteraga läbi (punane joon); peapoolne osa pannakse sugunäärmete fikseerimiseks ette nähtud lahusesse ja sabapoolne osa neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse.



▼M7

6. liide

SOOVITATAV PROOVIVÕTMISE KORD VITELLOGENIINI MÄÄRAMISE PUHUL

Tuleks olla hoolikas, et hoida ära isas- ja emaskalade vitellogeniiniproovide ristsaastumist.

Meetod 1A: tüseda tõmpnina vere võtmine sabaveenist/-arterist

Pärast tuimastamist lõigatakse sabavars skalpelliteraga osaliselt läbi ja veri kogutakse sabaveenist/-arterist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartorusse. Kui veri on kogutud, eraldatakse kiiresti plasma tsentrifuugimisega 3 minuti jooksul 15 000 *g* juures (või selle asemel 10 minuti jooksul 15 000 *g* ja 4 °C juures). Soovi korral võib määrata pärast tsentrifuugimist hematokriti. Plasmaosa eemaldatakse seejärel hematokriti määramiseks ette nähtud mikrokapillaartorust ja säilitatakse tsentrifuugitopsis 0,13 ühiku aprotiniini (proteaasiinhibiitor) juuresolekul – 80 °C juures, kuni on võimalik määrata vitellogeniin. Olenevalt tüseda tõmpnina suurusest (see sõltub soost), on ühelt kalalt kogutava plasma maht tavaliselt vahemikus 5–60 mikroliitrit (Jensen *et al.*, 2001).

Meetod 1B: tüseda tõmpnina vere võtmine südamest

Teise võimalusena võib vere koguda südamepunktsiooniga; selleks kasutatakse hepariniseeritud süstalt (1 000 ühikut hepariini ml kohta). Veri viiakse jääl hoitavasse Eppendorfi katsutisse ja seejärel tsentrifuugitakse (5 minutit 7 000 *g* juures toatemperatuuril). Plasma kantakse üle puhastesse Eppendorfi katsutitesse (alikvootidena, kui plasma maht seda võimaldab) ja külmutatakse viivitamata – 80 °C juures, kus seda säilitatakse kuni analüüsimiseni (Panter *et al.*, 1998).

Meetod 2A: jaapani riisikala maksa väljalõikamine

Katses kasutatavate kalade eemaldamine katsekambrist

1) Katses kasutatavad kalad tuleks katsekambrist eemaldada väikese kahvaga. Tuleb olla hoolikas, et mitte pillata kalu teise katsekambrisse.

2) Üldjuhul tuleks katses kasutatavad kalad eemaldada järgmises järjekorras: kontrollrühm, lahustiga kontrollrühm (vajaduse korral), madalaima kontsentratsiooniga rühm, keskmise kontsentratsiooniga rühm, kõrgeima kontsentratsiooniga rühm ja positiivne kontroll. Peale selle tuleks ühest katsekambrist eemaldada kõigepealt kõik isaskalad ja seejärel allesjäänud emaskalad.

3) Iga kala sugu tehakse kindlaks väliste teiseste sootunnuste (nt pärakuuime kuju) järgi.

4) Uuritavad kalad paigutatakse transpordimahutisse ja viiakse maksa väljalõikamiseks töölauale. Kontrollitakse katsekambri ja transpordimahuti märgistuse õigsust ning veendutakse, et katsekambrist võetud kalade arv ja katsekambrisse jäänud kalade arv vastavad eeldustele.

5) Kui kalade sugu ei ole võimalik tuvastada välise vaatlusega, eemaldatakse katsekambrist kõik kalad. Sellisel juhul tuleks nende sugu määrata sugunäärmete või teiseste sootunnuste vaatlemisega stereomikroskoobi abil.

Maksa väljalõikamine

1) Kala viiakse väikese kahvaga transpordimahutist üle tuimastilahusesse.

▼M7

2) Pärast tuimastamist tõstetakse kala tavaliste pintsettidega filterpaberile (või paberrätikule). Kala haaratakse pintsettidega pea külgedelt, et saba ära ei murduks.

3) Vesi pühitakse kala pealt filterpaberisse (või paberrätikusse).

4) Kala asetatakse kõhuga ülespoole. Seejärel tehakse lahkamiskääridega kõhupoolse kaelaosa ja kõhu keskosa vahele väike ristilõige.

5) Lahkamiskäärid viiakse väikesesse sisselõikesse ja kõht lõigatakse piki keskjoont lahti lõpusekattest saba pool asuvast punktist kuni päraku peapoolse servani. Tuleb jälgida, et kääre ei viidaks liiga sügavale ning maks ja sugunäärmed ei saaks viga.

6) Järgmised toimingud tehakse stereomikroskoobi all.

7) Kala asetatakse paberrätikule (või klaasist Petri tassile või alusklaasile) kõhuga ülespoole.

8) Kõhuõõne seinad venitatakse täppispintsettidega laiali ja siseelundid tõmmatakse välja. Vajaduse korral võib siseelundite väljatõmbamiseks eemaldada kõhuõõne ühe seina.

9) Teise paari täppispintsettide abil tuuakse esile maksa ja sapipõie ühenduskoht. Haaratakse kinni sapijuhast ja lõigatakse sapipõis ära. Tuleb olla ettevaatlik, et sapipõis ei läheks katki.

10) Haaratakse kinni söögitorust ja lõigatakse seedekulgla samal viisil maksast lahti. Tuleb jälgida, et seedekulgla sisu ei voolaks välja. Seedekulgla sabapoolne osa lõigatakse päraku küljest lahti ja seedekulgla eemaldatakse kõhuõõnest.

11) Kärbitakse maksaga külgnevat rasvkude ja muid kudesid. Tuleb olla ettevaatlik, et maks ei saaks kriimustada.

12) Täppispintsettidega haaratakse kinni maksa väratipiirkonnast ja maks eemaldatakse kõhuõõnest.

13) Maks asetatakse alusklaasile. Vajaduse korral eemaldatakse täppispintsettidega maksa pinnalt kogu rasv ja muu kude (nt kõhukelme).

14) Maks kaalutakse elektroonilise analüütilise kaaluga; taarana kasutatakse 1,5 ml mikrokatsutit. Maksa mass märgitakse töölehele (täpsusega 0,1 mg). Kontrollitakse mikrokatsuti etiketil oleva identimisteabe õigsust.

15) Maksa sisaldav mikrokatsuti suletakse korgiga. Mikrokatsuti paigutatakse jahutavasse (või jääl olevasse) hoidjasse.

16) Pärast ühe maksa väljalõikamist puhastatakse lahkamisriistad või asendatakse need puhastega.

▼M7

17) Eespool kirjeldatud viisil eemaldatakse maks kõikidelt transpordimahutis olevatelt kaladelt.

18) Pärast seda, kui maks on kõikidelt transpordimahutis olnud kaladelt (st kõigilt katsekambris olnud isas- ja emaskaladelt) eemaldatud, pannakse kõik maksaproovid katsutihoidjasse, mis on varustatud identimisandmetega etiketiga, ja säilitatakse seda sügavkülmikus. Kui maksa hakatakse eeltöötlema varsti pärast väljalõikamist, viiakse proovid jahutavas (või jääl olevas) katsutihoidjas järgmisele töölauale.

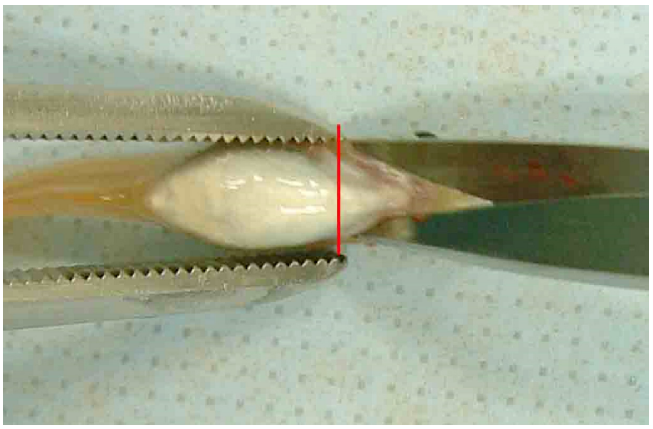
Pärast kalalt maksa väljalõikamist on rümp valmis sugunäärmete histoloogiliseks uurimiseks ja teiseste sootunnuste mõõtmiseks.

Proov

Kui maksaproove ei hakata eeltöötlema vahetult pärast väljalõikamist, säilitatakse neid temperatuuril ≤ – 70 °C.

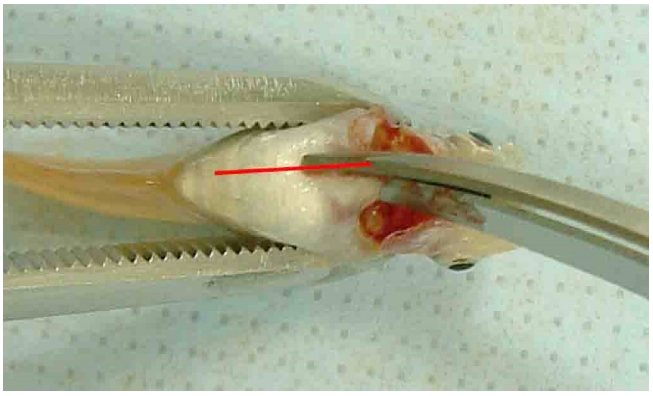
Joonis 1

Lõige kääridega tehakse vahetult rinnauimedest eespool.



Joonis 2

Kõht lõigatakse kääridega keskjoont mööda lahti punktini, mis asub umbes 2 mm pärakust pea pool.



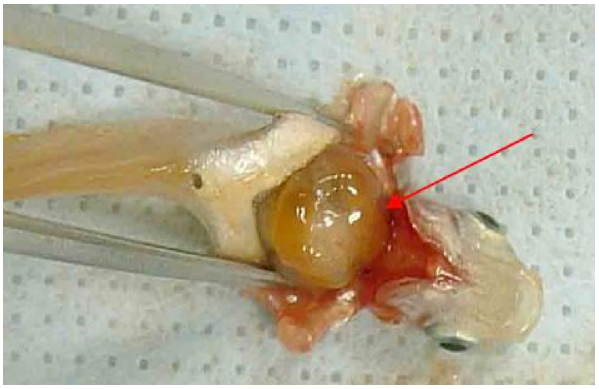
▼M7

Joonis 3

Kõhuõõne seinad tõmmatakse pintsettidega laiali, et paljastada maks ja muud siseelundid.

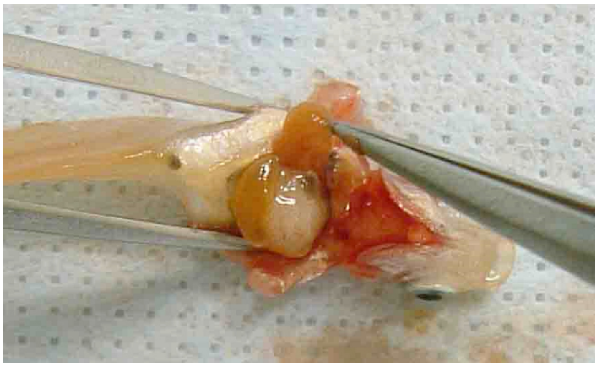
(Teise võimalusena võib kõhuõõne seinad küljele lahti tõmmatult kinnitada nõeltega.)

Nool näitab maksa.



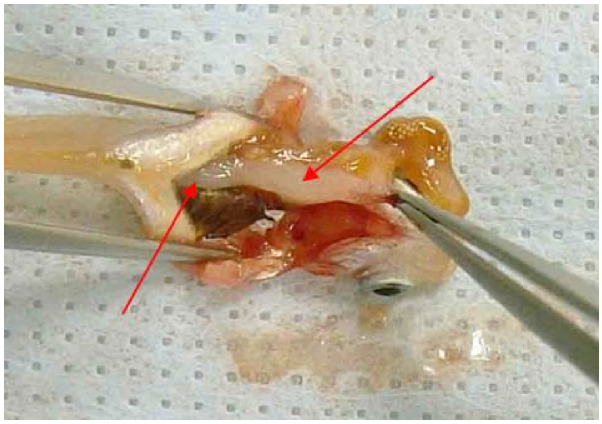
Joonis 4

Maks eraldatakse pintsettide abil ümbritsevatest kudedest ja lõigatakse välja.



Joonis 5

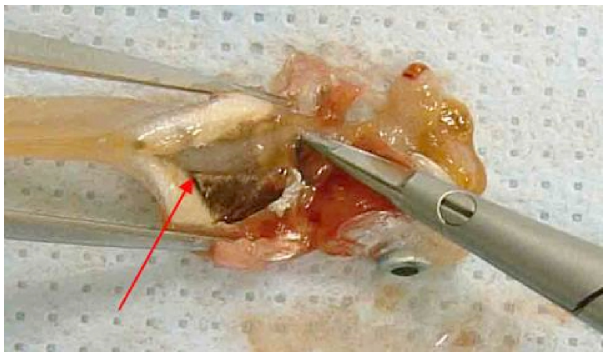
Sooled tõmmatakse pintsettidega ettevaatlikult eemale.



▼M7

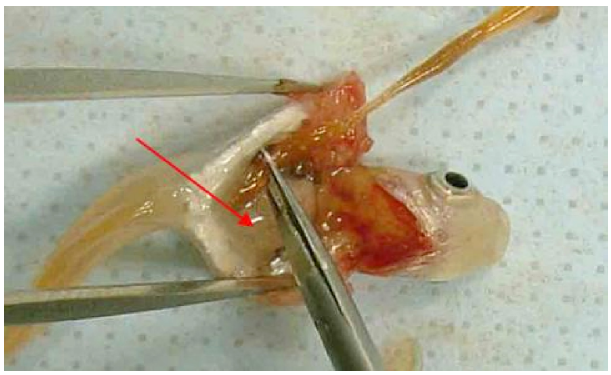
Joonis 6

Soolestiku kumbki ots ja soolekinnistid lõigatakse kääridega lahti.



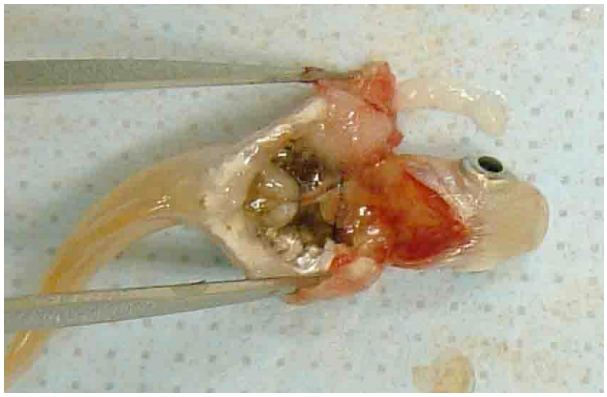
Joonis 7 (emaskala)

Emaskala puhul toimitakse samal viisil.



Joonis 8

Lõpule viidud lahkamine.



▼M7

Meetod 2B: jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) maksa eeltöötlemine vitellogeniini määramiseks

ELISA komplekti kuuluv pudel homogeniseerimispuhvriga jahutatakse purustatud jää abil maha (lahuse temperatuurini ≤ 4 °C). Kui kasutatakse EnBio ELISA süsteemi homogeniseerimispuhvrit, sulatatakse lahus toatemperatuuril ja jahutatakse seejärel purustatud jääga maha.

Maksa massi põhjal arvutatakse vajalik homogeniseerimispuhvri kogus (maksa mg kohta võetakse 50 µl homogeniseerimispuhvrit). Kui maksa mass on näiteks 4,5 mg, on vaja 225 µl homogeniseerimispuhvrit. Koostatakse homogeniseerimispuhvri koguste loetelu kõikide maksade jaoks.

Maksa ettevalmistamine eeltöötlemiseks

1) Maksa sisaldav 1,5 ml mikrokatsuti võetakse sügavkülmikust välja vahetult enne eeltöötlemist.

2) Isaskalade maksa eeltöötlus peaks toimuma enne emaskalade maksa eeltöötlust, et hoida ära vitellogeniiniga saastumist. Peale selle peaks katses kasutatavate rühmade maksade eeltöötlemine toimuma järgmises järjekorras: kontrollrühm, lahustiga kontrollrühm (vajaduse korral), madalaima kontsentratsiooniga rühm, keskmise kontsentratsiooniga rühm, kõrgeima kontsentratsiooniga rühm ja positiivne kontroll.

3) Sügavkülmikust ei tohiks korraga välja võtta rohkem maksaprooviga 1,5 ml mikrokatsuteid, kui on võimalik üheaegselt tsentrifuugida.

4) Maksaprooviga 1,5 ml mikrokatsutid asetatakse jääl olevasse hoidjasse proovi numbril põhinevas järjekorras (maksa ei ole vaja üles sulatada).

Eeltöötluse tegemine

1) Homogeniseerimispuhvri lisamine

   Homogeniseerimispuhvri koguste loetelust vaadatakse, milline kogus puhvrit tuleb konkreetsele maksaproovile lisada, ning mikropipett (mahuvahemikuga 100–1 000 µl) seatakse vajalikule mahule. Mikropipeti otsa kinnitatakse puhas otsik.

   Reaktiivipudelist võetakse vajalik kogus homogeniseerimispuhvrit ja lisatakse maksa sisaldavasse 1,5 ml mikrokatsutisse.

   Homogeniseerimispuhver lisatakse samal viisil kõikidesse maksa sisaldavatesse 1,5 ml mikrokatsutitesse. Mikropipeti otsikut ei ole seejuures vaja vahetada. Kui otsik saastub või tekib saastumise kahtlus, tuleks otsik siiski välja vahetada.

2) Maksa homogeniseerimine

   — Mikrokatsutis homogeniseerimise seadmele pannakse uus nui.

   — Nui viiakse 1,5 ml mikrokatsutisse. Mikrokatsutis homogeniseerimise seadet hoitakse nii, et maks oleks pressitud nuia ja 1,5 ml mikrokatsuti seina vahele.

   — Homogenisaatoril lastakse töötada 10–20 sekundit. Homogeniseerimise ajal jahutatakse 1,5 ml mikrokatsutit purustatud jääga.

▼M7

— Nui tõstetakse 1,5 ml mikrokatsutist välja ja segul lastakse umbes 10 sekundit seista. Seejärel vaadeldakse suspensiooni.

— Kui suspensioonis on näha maksatükikesi, korratakse kolmandat ja neljandat toimingut, et saada rahuldav maksahomogenaat.

— Maksasuspensiooni hoitakse jahutatult jääl olevas katsutihoidjas kuni tsentrifuugimiseni.

— Enne iga homogeniseerimist vahetatakse homogenisaatori nui uue vastu.

— Kõik maksad homogeniseeritakse homogeniseerimispuhvriga vastavalt eespool kirjeldatud korrale.

3) Homogeniseeritud maksasuspensiooni tsentrifuugimine

— Kontrollitakse, et jahutatud tsentrifuugikambri temperatuur on ≤ 5 °C.

— Homogeniseeritud maksasuspensiooniga 1,5 ml mikrokatsutid pannakse jahutatud tsentrifuugi (vajaduse korral tsentrifuug tasakaalustatakse).

— Homogeniseeritud maksasuspensiooni tsentrifuugitakse 13 000 *g* juures 10 minutit temperatuuril ≤ 5 °C. Kui supernatant eraldub korralikult, võib tsentrifugaaljõudu ja kestust vastavalt vajadusele muuta.

— Pärast tsentrifuugimist kontrollitakse, et supernatant on piisaval määral eraldunud (pinnal – lipiidid, keskel – supernatant, põhjakihis – maksakude). Kui eraldumine ei ole piisav, tsentrifuugitakse suspensiooni samades tingimustes uuesti.

— Kõik proovid võetakse jahutatud tsentrifuugist välja ja pannakse proovi numbril põhinevas järjekorras jääl olevasse katsutihoidjasse. Tuleb olla ettevaatlik, et tsentrifuugimisel eraldunud kihte mitte uuesti suspendeerida.

4) Supernatandi kogumine

— Katsutihoidjasse pannakse neli supernatandi säilitamiseks ette nähtud 0,5 ml mikrokatsutit.

— Mikropipetiga võetakse 30 µl supernatanti (keskmine kiht) ja viiakse see ühte 0,5 ml mikrokatsutisse. Tuleb jälgida, et ei võetaks pinnakihist lipiide ega põhjakihist maksakude.

— Eespool kirjeldatud viisil võetakse veel supernatanti ja viiakse see kahte teise 0,5 ml mikrokatsutisse.

— Mikropipetiga kogutakse ka ülejäänud supernatant (võimaluse korral ≥ 100 µl), mis pannakse viimasesse 0,5 ml mikrokatsutisse. Tuleb jälgida, et ei võetaks pinnakihist lipiide ega põhjakihist maksakude.

— 0,5 ml mikrokatsuti suletakse korgiga ja supernatandi maht märgitakse etiketile. Seejärel jahutatakse mikrokatsutid jääl olevas katsutihoidjas viivitamata maha.

— Iga kord enne uue supernatandi võtmist vahetatakse mikropipeti otsik uue vastu. Kui otsiku külge kleepub suur kogus lipiide, vahetatakse see kohe uue vastu, et hoida ära maksaekstrakti saastumist rasvaga.

▼M7

— Kõikide tsentrifuugitud proovide supernatant viiakse eespool kirjeldatud korra kohaselt nelja 0,5 ml mikrokatsutisse.

— Pärast supernatandi viimist 0,5 ml mikrokatsutitesse pannakse kõik katsutid identimisetiketiga katsutihoidjasse ja külmutatakse seejärel viivitamata sügavkülmikus. Kui vitellogeniini kontsentratsiooni mõõdetakse kohe pärast eeltöötlemist, hoitakse ühte 30 µl supernatanti sisaldavat 0,5 ml mikrokatsutit jahutatult katsutihoidjas ja viiakse see töölauale, kus tehakse ELISA. Sellisel juhul pannakse ülejäänud mikrokatsutid katsutihoidjatesse ja külmutatakse need sügavkülmikus.

— Pärast supernatandi kogumist kõrvaldatakse ülejäänud materjal nõuetekohaselt.

Proovide säilitamine

Maksahomogenaadi supernatandiga 0,5 ml mikrokatsuteid säilitatakse temperatuuril ≤ – 70 °C kuni ELISA tegemiseni.

Meetod 3A: vöödilise daanio vere võtmine sabaveenist/-arterist

Kohe pärast tuimastamist lõigatakse sabavars risti läbi ja veri kogutakse sabaveenist/-arterist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartorusse. Võetava vere kogus on kala suurusest sõltuvalt 5–15 µl. Mikrokapillaartorusse lisatakse võrdne kogus aprotiniiniga puhvrit (6 µg/ml fosfaadiga puhverdatud soolalahuses (PBS)) ja plasma eraldatakse verest tsentrifuugimise teel (5 minutit 600 *g* juures). Plasma kogutakse katsutitesse ja säilitatakse temperatuuril – 20 °C kuni vitellogeniini või muude huvipakkuvate valkude määramiseni.

Meetod 3B: vöödilise daanio vere võtmine südamepunktsiooniga

Vere hüübimise ja valkude lagunemise takistamiseks võetakse proovid PBSi, mis sisaldab hepariini (1 000 ühikut/ml) ja proteaasiinhibiitorit aprotiniini (2 trüpsiiniinhibiitori ühikut (TIU) / ml). Puhvri koostisainetena soovitatakse kasutada hepariini ammooniumisoola ja lüofiliseeritud aprotiniini. Vereproovi võtmiseks soovitatakse kasutada fikseeritud peene nõelaga 1 ml süstalt (nt Braun Omnikan-F). Süstlasse tuleks eelnevalt võtta puhverlahust (ligikaudu 100 µl), et iga kala väike verekogus süstlast täielikult kätte saada. Vereproovid võetakse südamepunktsiooniga. Kõigepealt tuleks kala tuimastada MS-222-ga (100 mg/l). Nõuetekohane tuimastus võimaldab proovivõtjal eristada vöödilise daanio südamelööke. Südame punkteerimisel hoitakse süstla kolbi nõrga tõmbe all. Kogutava vere maht on vahemikus 20–40 mikroliitrit. Pärast südamepunktsiooni tuleks vere ja puhvri segu viia katsutisse. Plasma eraldatakse verest tsentrifuugimise teel (20 minutit 5 000 g juures) ja seda tuleks säilitada –80 °C juures kuni analüüsi tegemiseni.

Meetod 3C: standardne töökord vöödilise daanio pea ja saba homogeniseerimiseks

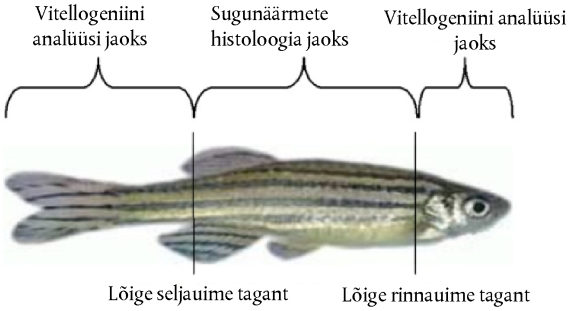
1. Kalad tuimastatakse ja surmatakse humaansel viisil vastavalt katsemeetodi kirjeldusele.

2. Kala pea ja saba lõigatakse ära nii, nagu on näidatud joonisel 1.

Oluline märkus: *kõik lõikeriistad ja lõikelaud tuleks enne iga kala lõikamist loputada ja korralikult puhastada (näiteks 96 % etanooliga), et hoida ära kemikaaliga mitte kokku puutunud isaskalade saastumist emaskalade ja kemikaaliga kokku puutunud isaskalade vitellogeniiniga.*

▼**M7**

Joonis 1



3. Iga kala pea ja saba kaalutakse koos ja nende summaarne mass määratakse milligrammi täpsusega.

4. Pärast kaalumist pannakse need kehaosad sobivasse katsutisse (nt 1,5 ml Eppendorfi katsuti) ja säilitatakse külmutatult – 80 °C juures kuni homogeniseerimiseni või homogeniseeritakse kohe jää peal kahe plastvarda abil. (Võib kasutada ka muid meetodeid, kui homogeniseerimine toimub jää peal ja saadakse homogeenne mass.) Oluline märkus: *katsutid peavad olema korralikult nummerdatud, nii et kala pea ja saba on seostatavad kala sugunäärmete histoloogiliseks uurimiseks kasutatava kehatükiga.*

5. Pärast ühtlase massi saavutamist lisatakse koe massi neljakordselt ületav kogus jääkülma **homogeniseerimispuhvrit** ([1]). Jätkatakse varrastega töötlemist, kuni segu on homogeenne. Oluline märkus: *iga kala puhul kasutatakse uusi vardaid.*

6. Proovid pannakse jääle kuni tsentrifuugimiseni (30 minutit **4 °C** ja 50 000 *g* juures).

7. Pipetiga pannakse vähemalt kahte katsutisse 20 µl supernatanti; pipeti ots viiakse allapoole pindmist rasvakihti ja supernatant eemaldatakse nii, et rasva- ja sademefraktsioon kaasa ei tuleks.

8. Katsuteid säilitatakse temperatuuril – 80 °C kuni proovide kasutamiseni.

([1]) Homogeniseerimispuhver:
— 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 % proteaasiinhibiitorite segu (Sigma): 12 ml Tris-HCl, pH 7,4 + 120 µl proteaasiinhibiitorite segu;
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), näiteks Taani firmalt Bie & Berntsen;
— proteaasiinhibiitorite segu: Sigma, tootenumber P8340 (imetajate kudede jaoks).
MÄRKUS: homogeniseerimispuhver peaks olema valmistatud proovide töötlemise päeval. Puhvrit hoitakse kasutamise ajal jää peal.

▼M7

7. liide

VITELLOGENIINIGA RIKASTATUD PROOVID JA ERI KATSETES KASUTATAV VÕRDLUSSTANDARD

Igal vitellogeniinianalüüsi tegemise päeval mõõdetakse ka rikastatud proovi, mis on valmistatud eri katsetes kasutatava võrdlusstandardiga. Vitellogeniin, millest valmistatakse eri katsetes kasutatav võrdlusstandard, peab olema muust partiist kui see, mida kasutatakse asjaomase katse kaliibrimisstandardite tegemiseks.

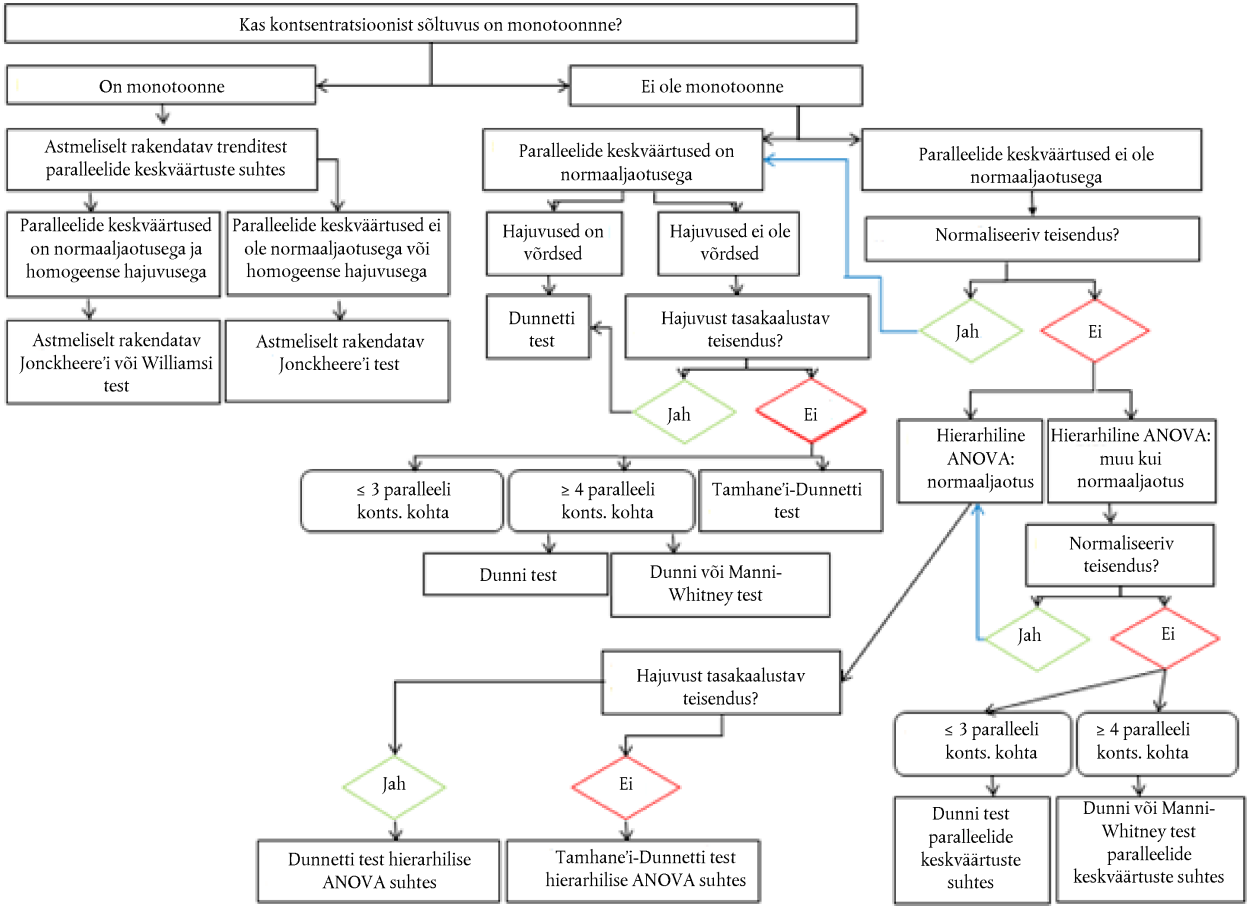
Rikastud proovi valmistamiseks lisatakse teadaolev kogus võrdlusstandardit kontrollrühma isaskalade plasmaproovile. Proovi rikastatakse nii, et saavutatav vitellogeniini kontsentratsioon on 10–100 korda suurem kui kontrollrühma isaskalade plasma eeldatav vitellogeniinisisaldus. Rikastatav kontrollrühma isaskalade plasma võib pärineda kas ühelt või mitmelt kalalt.

Kontrollrühma isaskalade rikastamata plasma osaproovi analüüsitakse vähemalt kahes paralleelkannus. Rikastatud plasmat analüüsitakse samuti vähemalt kahes paralleelkannus. Eeldatava kontsentratsiooni arvutamiseks liidetakse plasma rikastamiseks lisatud arvutuslikule vitellogeniinikogusele kontrollrühma isaskalade kahes rikastamata proovis mõõdetud vitellogeniinikoguste keskväärtus. Saadud eeldatava kontsentratsiooni ja mõõdetud kontsentratsiooni suhtarv esitatakse koos iga samal päeval tehtud katse tulemustega.

▼M7

8. liide

STATISTILISE ANALÜÜSI VALIMISE VOOSKEEM



▼M7

C.49. **Ägeda mürgisuse katse kalaembrüotega**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 236 (2013). Selles kirjeldatakse vöödilise daanio (*Danio rerio*) embrüotele avalduva ägeda mürgisuse katset. Käesolev meetod on ette nähtud kemikaalide ägeda mürgisuse määramiseks embrüonaalses arengujärgus kaladel. See põhineb vöödilise daanioga tehtud uuringutel ja valideerimistel (1–14). Käesolevat katsemeetodit on edukalt kasutatud paljude eri kemikaalide puhul, millel on erinev toimemehhanism, lahustuvus, lenduvus ja hüdrofoobsus (vastav ülevaade on esitatud viidetes 15 ja 16).

2. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

3. Vöödilise daanio äsja viljastatud marjaterad viiakse 96 tunniks kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Iga 24 tunni järel registreeritakse letaalsuse näitajatena kuni nelja järgmise lõppnäitaja vaatluse tulemused (6): i) viljastatud marjaterade koaguleerumine, ii) somiitide moodustumata jäämine, iii) sabaalgme rebukotist eraldumata jäämine ja iv) südamelöökide puudumine. Kokkupuuteperioodi lõpus määratakse äge mürgisus positiivsete tulemuste alusel, mis saadakse ükskõik millises nimetatud neljast lõppnäitaja vaatlusest, ning arvutatakse LC_{50}.

LÄHTEKAALUTLUSED

4. Iga aine kohta on muu hulgas kasulik teada selle struktuurivalemit, molekulmassi, puhtust, püsivust vees ja valguse käes, pK_a-d, K_{ow}-d, lahustuvust vees ja aururõhku, samuti kiire biolagundatavuse katse tulemusi (katsemeetod C.4 (17) või C.29 (18)). Lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas katse ajal võib esineda uuritava kemikaali kadu aurustumise tõttu. Aine kvantifitseerimiseks katselahuses peaks olemas olema usaldusväärne teadaoleva dokumenteeritud täpsuse ja avastamispiiriga analüüsimeetod.

5. Kui käesolevat katsemeetodit kasutatakse segu analüüsimiseks, peaks selline segu olema võimalikult hästi iseloomustatud, näiteks selle koostisainete keemilise määratluse, kvantitatiivse sisalduse ja iga koostisaine omaduste kaudu (vt punkt 4). Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks kohustuslikus korras tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse taotletava regulatiivse eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused.

6. Ainete puhul, mis võidakse aktiveerida metabolismi teel, on leitud tõendeid selle kohta, et vöödilise daanio embrüod on võimelised neid biomuundama (19–22). Metabolism kalaembrüos ei ole siiski alati sarnane noorjärgus või täiskasvanud kalade metabolismiga. Näiteks ei ole kalaembrüotega tehtud ägeda mürgisuse katses suudetud tuvastada mürkaine lähteaine allüülalkoholi (9) mürgisust. Seepärast soovitatakse juhul, kui on alust arvata, et kemikaali metaboliidid või muud asjakohased muundamissaadused võivad olla lähteühendist mürgisemad, vaadelda katses ka selliseid metaboliite/muundamissaadusi ja võtta saadud tulemusi uuritava kemikaali mürgisuse üle otsustamisel arvesse või teha teise võimalusena eraldi katse metabolismi täiendavaks arvessevõtmiseks.

7. Ainete puhul, mille molekulmass on ≥ 3 kDa, millel on väga ulatuslik molekulaarstruktuur või mis põhjustavad koorumise hilinemist, nii et koorumisjärgne kokkupuude ainega võib puududa või toimuda väiksemal määral, ei eeldata embrüote tundlikkust neile, kuna sellise aine biosaadavus on piiratud; sel juhul võib olla sobivam kasutada mõnda muud mürgisuse hindamise meetodit.

▼M7

KATSE NÕUETEKOHASUS

8. Katsetulemused on nõuetekohased, kui on täidetud järgmised kriteeriumid:

a) viljastamise üldmäär kõikide kogutud marjaterade seas peaks katsealuses partiis olema ≥ 70 %;

b) veetemperatuur katsekambrites peaks katse mis tahes hetkel olema 26 ± 1 °C;

c) embrüote üldine elulemus peaks negatiivse (lahjendusveega) kontrolli ja vajaduse korral lahustiga kontrolli puhul olema 96 tunni pikkuse kokkupuute lõpuks ≥ 90 %;

d) kokkupuutel positiivse kontrolliga (nt vöödilise daanio puhul 3,4-dikloroaniliin kontsentratsioonis 4,0 mg/l) peaks suremus olema 96 tunni pikkuse kokkupuute lõpuks vähemalt 30 %;

e) koorumise määr negatiivse kontrolli (ja vajaduse korral lahustiga kontrolli) puhul peaks olema 96 tunni pikkuse kokkupuute lõpuks ≥ 80 %;

f) lahustunud hapniku sisaldus negatiivse kontrolli ja suurima katses kasutatud kontsentratsiooni puhul peaks 96 tunni pikkuse kokkupuute lõpuks olema ≥ 80 % küllastuskontsentratsioonist.

MEETODI KIRJELDUS

9. Soovitatavate pidamis- ja katsetingimuste ülevaade on esitatud 2. liites.

Seadmed

10. On vaja järgmisi seadmeid:

a) soovitatava biomassisisalduse jaoks piisava suurusega keemiliselt inertsest materjalist (nt klaasist) akvaariumid (vt punkt 14 „Sugukalade pidamine“);

b) invertmikroskoop ja/või binokulaarmikroskoop suurendusvõimega vähemalt 80 korda. Kui vaatluste registreerimise ruumis ei ole võimalik saavutada temperatuuri 26 ± 1 °C, on vaja kasutada reguleeritava temperatuuriga liigutatavat preparaadihoidjat või mõnda muud temperatuuri hoidmiseks sobivat meetodit;

c) katsekambrid, nt standardsed 24 kannuga plaadid sügavusega umbes 20 mm (vt punkt 11 „Katsekambrid“);

d) materjal 24-kannulise plaadi katmiseks, nt isekleepuv foolium;

e) reguleeritava temperatuuriga inkubaator või kliimaseadmega ruum, mis võimaldab hoida plaadi kannudes (või katsekambrites) temperatuuri 26 ± 1 °C;

f) pH-meeter;

g) hapnikumõõtur;

h) seadmed vee kareduse ja juhtivuse määramiseks;

i) kudemisalus: klaasist, roostevabast terasest või muust inertsest materjalist instrumendinõu; roostevabast terasest või muust inertsest materjalist traatvõrk (silma suurus 2 ± 0,5 mm) koetud marjaterade kaitseks; kudemissubstraat (nt inertsest materjalist kunsttaimed) (katsemeetodi C.48 4A liide (23));

j) laia otsaga pipetid marjaterade kogumiseks;

▼M7

k) klaasnõud eri kontsentratsiooniga katselahuste ja lahjendusvee valmistamiseks (keeduklaasid, mõõtekolvid, -silindrid ja -pipetid) ja vöödilise daanio marjaterade kogumiseks (nt keeduklaasid, kristalliseerimisnõud);

l) kui katse läbiviimiseks kasutatakse teistsugust kokkupuutesüsteemi, näiteks läbivoolusüsteemi (24) või passiivset doseerimissüsteemi (25), on vaja selleks sobivaid ruume ja seadmeid.

Katsekambrid

11. Tuleks kasutada klaasist või polüstüreenist katsekambreid (nt 24-kannulised plaadid kannu mahutavusega 2,5–5 ml). Kui kahtlustatakse adsorbeerumist polüstüreenile (nt mittepolaarsete, tasapinnalise struktuuri ja suure K_{OW}-ga ainete puhul), tuleks adsorbeerumisest tingitud kao vähendamiseks kasutada inertset materjali (klaas) (26). Katsekambrite paigutus inkubaatoris peaks olema juhuslik.

Vesi ja katsetingimused

12. Kalade pidamise vett soovitatakse lahjendada, et saavutada pinnavee paljude eri tüüpide puhul tavapärane karedus. Lahjendusvesi tuleks valmistada taastatud veest (27). Lõppkaredus peaks vastama $CaCO_3$ sisaldusele 100–300 mg/l, et ei toimuks kaltsiumkarbonaadi ulatuslikku väljasadenemist. Võib kasutada ka põhjalikult iseloomustatud pinna- või kaevuvett. Taastatud vett võib kalade pidamise vee väikese kareduse arvessevõtmiseks lahjendada deioniseeritud veega suhtes kuni 1:5, nii et saavutatav karedus vastaks $CaCO_3$ sisaldusele vähemalt 30–35 mg/l. Enne uuritava kemikaali lisamist aereeritakse vett hapnikuga küllastumiseni. Kannudes tuleks kogu katse vältel hoida temperatuuri 26 ± 1 °C. Lahuse pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5 ning ei tohiks katse kestel varieeruda selles vahemikus rohkem kui 1,5 ühikut. Kui pH ei püsi eeldatavalt selles vahemikus, tuleks enne katse algust pH-d reguleerida. Seda tuleks teha nii, et põhilahuse kontsentratsioon sellest märkimisväärselt ei muutuks ning uuritav kemikaal ei sadeneks ega osaleks üheski keemilises reaktsioonis. Uuritavat kemikaali sisaldava lahuse pH reguleerimiseks soovitatakse kasutada vesinikkloriidi (HCl) või naatriumhüdroksiidi (NaOH).

Katselahused

13. Valitud kontsentratsiooniga katselahused võib valmistada näiteks põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahjendusvees mehaanilisel teel (nt segamine ja/või ultrahelitöötlus) soovitatavalt lihtsalt segada või loksutada. Kui uuritav kemikaal on vees raskesti lahustuv, tuleks järgida raskesti uuritavaid aineid ja segusid käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 23 kirjeldatud korda (28). Lahusti kasutamisest tuleks hoiduda, kuid mõnel juhul võib see olla sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks vajalik. Kui põhilahuse valmistamise hõlbustamiseks kasutatakse lahustit, ei tohiks selle lõppsisaldus olla suurem kui 100 µl/l ja peaks kõikides katsenõudes olema sama. Lahusti kasutamise korral on vaja kasutada täiendavat lahustiga kontrolli.

Sugukalade pidamine

14. Marja saamiseks kasutatakse kemikaaliga mitte kokku puutunud looduslikku vöödilise daanio sugukarja, kus marjaterade viljastamise määr on korralikult dokumenteeritud. Kaladel ei tohiks ilmneda mingeid makroskoopiliselt tuvastatavaid nakatumis- ega haigusnähte ning neile ei tohiks kudemisele eelneva 2 kuu jooksul olla antud aktiiv- või profülaktilise ravi eesmärgil mingeid ravimeid. Sugukarja kalu peetakse akvaariumis soovitatavalt tihedusel üks kala liitri vee kohta ning valgustusperioodi kindlaksmääratud

▼M7

pikkus on 12–16 tundi (29–33). Filtrimiskiirus peaks olema optimaalne; tuleks hoiduda vee ulatuslikku liikumist põhjustava liiga suure filtrimiskiiruse kasutamisest. Söötmistingimusi on kirjeldatud 2. liites. Tuleks jälgida, et sööta ei jääks üle, ning kontrollida korrapäraselt vee kvaliteeti ja akvaariumi puhtust ning vajaduse korral taastada algseisund.

Pädevuse tõendamise katsed

15. Kasutatava kalaliini tundlikkuse kontrollimiseks tuleks soovitatavalt kaks korda aastas teha kogu kontsentratsioonist sõltuvuse vahemikku hõlmav katse võrdluskemikaali 3,4-dikloroaniliiniga, mida kasutati valideerimiskatsetes (1, 2). Nimetatud võrdluskemikaali tuleks kasutada igas laboris, kus käesolev katsemeetod esmakordselt kasutusele võetakse. Seda kemikaali võib laboris kasutada katse tegemiseks vajaliku tehnilise pädevuse tõendamiseks enne regulatiivsel eesmärgil andmete esitamist.

Marja saamine

16. Vöödilise daanio marjaterad võib saada kudemisrühmadest (eraldi kudemisnõudes) või masskudemise teel (kalade pidamise nõudes). Kudemisrühmade puhul viiakse sugukarja isas- ja emaskalad (nt suhtes 2:1) katsele eelneval päeval mõni tund enne pimeduse saabumist kudemisnõudesse. Kuna vöödilise daanio puhul võib kudemine mõnes kudemisrühmas ebaõnnestuda, soovitatakse kasutada paralleelselt vähemalt kolme kudemisnõu. Geneetilise representatiivsuse tagamiseks kogutakse marjaterad vähemalt kolmest kudemisrühmast, segatakse omavahel ja tehakse juhuslik valik.

17. Kudemisalus pannakse marjaterade kogumiseks kudemisnõusse või kalade pidamise nõusse katsele eelneval päeval enne pimeduse saabumist või katse alguspäeval enne valguse saabumist. Kudemisalus kaetakse inertse traatvõrguga, millel on sobiv silma suurus (umbes 2 ± 0,5 mm), et vöödilise daanio täiskasvanud isendid marjateri ära ei sööks. Vajaduse korral võib kudemise soodustamiseks kinnitada võrgu külge inertsest materjalist (nt plastist või klaasist) kunsttaimi (3–5, 23, 35). Tuleks kasutada kulunud plastmaterjali, mille puhul ei toimu (nt ftalaatide) leostumist. Paaritumine, kudemine ja viljastamine leiavad aset 30 minuti jooksul pärast valguse saabumist ja seejärel võib kudemisalused koos marjateradega ettevaatlikult eemaldada. Kudemisaluselt kogutud marjateri soovitatakse loputada taastatud veega.

Marjaterade eristamine

18. Temperatuuril 26 °C toimub umbes 15 minuti pärast viljastatud marjaterade esimene lõigustumine ning järgnevate sünkroonsete lõigustumiste tulemusena tekib 4, 8, 16 ja 32 blastomeeri (vt 3. liide) (35). Selles etapis on viljastatud marjaterad blastula väljakujunemise järgi selgelt eristatavad.

KATSE KÄIK

Kokkupuutetingimused

19. Uuritava kemikaaliga viiakse kokkupuutesse 20 embrüot ühe kontsentratsioonipunkti kohta (üks embrüo kannu kohta). Kokkupuutekontsentratsioon ei tohi kogu katse vältel erineda kemikaali nominaalsest kontsentratsioonist rohkem kui ± 20 %. Kui see ei ole staatilises süsteemis võimalik, tuleks lahust poolstaatilise režiimi kohaselt sobiva sagedusega uuendada (nt iga 24 tunni järel). Sel juhul tuleb kokkupuutekontsentratsioone kontrollida iga sellise kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt suurimal ja väikseimal katsekontsentratsioonil (vt punkt 36). Kui kokkupuutekontsentratsiooni ei suudeta hoida vahemikus ± 20 % nominaalsest kontsentratsioonist, tuleb iga kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus mõõta kõik kontsentratsioonid (vt punkt 36). Lahuse uuendamise ajal tuleks jälgida, et embrüod oleksid kaetud väikese koguse vana katselahusega ega jääks kuivale. Katseplaani võib

▼M7

kohandada vastavalt konkreetse ainega seotud katsenõuetele (nt läbivoolusüsteemi (24) või passiivse doseerimissüsteemi (25) kasutamine hõlpsalt lagundatava või väga adsorbeeruva aine jaoks (29) või mõne muu süsteemi kasutamine lenduva aine jaoks (36, 37)). Igal juhul tuleks hoolitseda selle eest, et embrüotele põhjustataks võimalikult vähe stressi. Katselahust tuleks enne katse alustamist vähemalt 24 tundi katsekambris hoida. Katsetingimuste ülevaade on esitatud 2. liites.

Katsekontsentratsioonid

20. Tavaliselt piisab statistikanõuete täitmiseks viiest uuritava kemikaali kontsentratsioonist, mille jada konstantne tegur ei ole suurem kui 2,2. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleks seda põhjendada. Katses kasutataval suurimal kontsentratsioonil peaks suremus olema soovitatavalt 100 % ning väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil peaks punktis 28 kirjeldatud täheldatav mõju soovitatavalt puuduma. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse läbiviimine enne lõplikku katset võimaldab valida sobiva kontsentratsioonivahemiku. See viiakse tavaliselt läbi kümne embrüoga kontsentratsioonipunkti kohta. Allpool esitatud juhiste puhul on eeldatud, et katse tehakse 24-kannuliste plaatidega. Teistsuguste katsekambrite (nt väikeste Petri tasside) või suurema arvu kontsentratsioonide kasutamise korral tuleb neid juhiseid vastavalt kohandada.

21. Üksikasjalik teave ja visuaalsed juhised kontsentratsioonipunktide jaotamise kohta 24-kannulistel plaatidel on esitatud punktis 27 ja 4. liites joonisel 1.

Kontrollid

22. Lahjendusveega kontrolle on vaja kasutada nii negatiivse kontrollina kui ka plaadisisese kontrollina. Kui plaadisisese kontrolli puhul täheldatakse üle 1 surnud embrüo, jäetakse asjaomane plaat kõrvale ning seega väheneb LC_{50} leidmiseks kasutatavate kontsentratsioonide arv. Terve plaadi kõrvalejätmine võib raskendada täheldatud mõju hindamist ja eristamist, eriti juhul, kui kõrvale jäetakse lahustiga kontrollplaat või plaat, kus mõju on avaldunud ka kemikaaliga kokku puutunud embrüotele. Esimesel juhul tuleb katset korrata. Teisel juhul võib terve(te) katserühma(de) kõrvaldamine sisemises kontrollis täheldatud suremuse tõttu piirata mõju hindamise ja LC_{50} määramise võimet.

23. Iga katses kasutatava marjaterade partii puhul kasutatakse positiivse kontrollina 3,4-dikloroaniliini kindlaksmääratud kontsentratsioonil 4 mg/l.

24. Lahusti kasutamise korral viiakse täiendav 20 embrüost koosnev rühm eraldi 24-kannulisel plaadil kokkupuutesse lahustiga – seda vaadeldakse lahustiga kontrollrühmana. Katse võib lugeda nõuetekohaseks, kui on tõendatud, et lahusti ei mõjuta märkimisväärselt koorumiseni kuluvat ajavahemikku ega elulemust ega avalda embrüotele muud negatiivset mõju (vt punkti 8 alapunkt c).

Kokkupuute algus ja katse kestus

25. Katset alustatakse võimalikult kiiresti pärast marjaterade viljastamist ja see lõpetatakse 96 tunni pikkuse kokkupuuteperioodi lõppedes. Embrüod peaksid olema ümbritsetud katselahusest enne blastodiski lõigustumise algust või hiljemalt 16-rakulisse staadiumisse jõudmise ajaks. Kokkupuute alustamiseks võimalikult väikese viivitusega valitakse juhuslikult vähemalt kaks korda suurem arv marjateri, kui on vajalik kõikide katserühmade jaoks, ja viiakse need hiljemalt 90 minutit pärast viljastamist eri kontsentratsiooniga lahustesse ja kontroll-lahustesse (nt 100 ml kristalliseerimisnõusse; marjaterad peaksid olema täielikult kaetud).

26. Elujõulised viljastatud marjaterad tuleks eraldada viljastamata marjateradest ja viia 24-kannulistele plaatidele, mida on eelnevalt 24 tundi katsetingimustes hoitud ja mille kannud on 180 minuti jooksul pärast viljastamist uuesti täidetud 2 ml värskelt valmistatud katselahusega. Stereomikroskoobi abil (soovitatavalt ≥ 30-kordse suurendusega) valitakse välja lõigustuvad

▼M7

viljastatud marjaterad, millel ei täheldata nähtavaid lõigustumishäireid (nt asümmeetriat, vesiikulite moodustumist) ega koorioni kahjustusi. Marjaterade kogumist ja eraldamist on kirjeldatud 3. liites joonistel 1 ja 3 ning 4. liites joonisel 2.

Marjaterade jaotamine 24-kannulistele plaatidele

27. Marjaterad jaotatakse kannudega plaatidele järgmiselt (vt ka 4. liite joonis 1):

— 20 marjatera ühele plaadile iga katsekontsentratsiooni kohta;

— 20 marjatera ühele lahustiga kontrollplaadile (vajaduse korral);

— 20 marjatera ühele positiivse kontrolli plaadile;

— 4 marjatera lahjendusvees plaadisisese kontrollina igale eespool nimetatud plaadile;

— 24 marjatera lahjendusvees ühele negatiivse kontrolli plaadile.

Vaatlused

28. Iga katses kasutatava embrüo puhul tehtavad lõppnäitajate vaatlused hõlmavad järgmist: embrüo koaguleerumine, somiitide moodustumata jäämine, saba eraldumata jäämine ja südamelöökide puudumine (tabel 1). Nende vaatluste tulemusi kasutatakse letaalsuse kindlakstegemiseks: ükskõik millise kõnealuse vaatluse positiivne tulemus tähendab seda, et asjaomane vöödilise daanio embrüo on surnud. Peale selle registreeritakse katse- ja kontrollrühmades alates esimese 48 tunni möödumisest iga päev koorumise määr. Vaatlustulemused registreeritakse iga 24 tunni järel, kuni katse on lõppenud.

Tabel 1

Lõppnäitajate vaatlused ägeda mürgisuse hindamiseks vöödilise daanio embrüotel 24–96 tundi pärast viljastamist

	Kokkupuuteaeg			
	24 tundi	48 tundi	72 tundi	96 tundi
Embrüote koaguleerumine	+	+	+	+
Somiitide moodustumata jäämine	+	+	+	+
Saba eraldumata jäämine	+	+	+	+
Südamelöökide puudumine		+	+	+

29. *Embrüote koaguleerumine:* koaguleerunud embrüod on piimjasvalged ja näevad mikroskoobi all välja tumedad (vt 5. liite joonis 1). Koaguleerunud embrüote arv tehakse kindlaks pärast 24, 48, 72 ja 96 tunni möödumist.

30. *Somiitide moodustumata jäämine:* normaalselt arenevas vöödilise daanio embrüos moodustub esimese 24 tunni jooksul temperatuuril 26 ± 1 °C umbes 20 somiiti (vt 5. liite joonis 2). Normaalselt arenenud embrüo liigutab end spontaanselt (kokkutõmbed küljelt küljele). Spontaansed liigutused annavad tunnistust somiitide moodustumisest. Somiitide puudumine registreeritakse pärast 24, 48, 72 ja 96 tunni möödumist. Somiitide moodustumata jäämine esimese 24 tunni jooksul võib olla tingitud arengu üldisest pidurdumisest. Somiidid peaksid olema tekkinud hiljemalt 48 tunni jooksul. Vastasel juhul loetakse asjaomane embrüo surnuks.

31. *Saba eraldumata jäämine:* normaalselt arenevas vöödilise daanio embrüos täheldatakse saba eraldumist rebukotist (vt 5. liite joonis 3) pärast embrüo

▼M7

keha tagaosa pikenemist. Saba eraldumata jäämine registreeritakse pärast 24, 48, 72 ja 96 tunni möödumist.

32. *Südamelöökide puudumine:* normaalselt arenevas vöödilise daanio embrüos on südamelöögid temperatuuril 26 ± 1 °C vaadeldavad pärast 48 tunni möödumist (vt 5. liite joonis 4). Selle lõppnäitaja registreerimisel tuleb olla eriti hoolikas, kuna ebakorrapäraseid südamelööke *ei* tohiks registreerida letaalsuse ilminguna. Peale selle ei peeta letaalseks ilminguks nähtavaid südamelööke ilma ringluseta kõhuaordis. Selle lõppnäitaja registreerimiseks tuleks embrüoid, kellel südamelöögid puuduvad, jälgida vähemalt 80-kordsel suurendusel vähemalt ühe minuti vältel. Südamelöökide puudumine registreeritakse pärast 48, 72 ja 96 tunni möödumist.

33. Koorumise määr nii katse- kui ka kontrollrühmades tuleks registreerida alates esimese 48 tunni möödumisest ja esitada see katseprotokollis. Ehkki koorumist ei kasutata lõppnäitajana LC_{50} arvutamiseks, võib see näitaja aidata andmeid tõlgendada, kuna koorumisega tagatakse embrüo kokkupuude kemikaaliga, ilma et koorioni võimalik kaitsefunktsioon seda takistaks.

34. Vöödilise daanio embrüo normaalset arengut (35) ja ebanormaalse arengu näiteid on üksikasjalikult kirjeldatud ja kujutatud 3. ja 5. liites.

Analüütilised mõõtmised

35. Katse alguses ja lõpus mõõdetakse kontrollrühma(de)s ja uuritava kemikaali suurima kontsentratsiooniga rühmas pH, üldkaredus ja juhtivus. Uuendamisel põhinevas poolstaatilises süsteemis tuleks pH mõõta enne ja pärast vee vahetamist. Lahustunud hapniku sisaldus mõõdetakse katse lõpus negatiivses kontrollis ja suurimal katses kasutatud kontsentratsioonil, mille juures embrüod on elujõulised; nendes rühmades peab see olema vastavuses katse nõuetekohasuse kriteeriumidega (vt punkti 8 alapunkt f). Kui on kahtlus, et temperatuur 24-kannuliste plaatide lõikes kõigub, mõõdetakse temperatuur kolmes juhuslikult valitud nõus. Soovitatavalt tuleks temperatuuri katse vältel registreerida pidevalt või vähemalt kord päevas.

36. Staatilises süsteemis tuleks uuritava kemikaali sisaldus mõõta katse alguses ja lõpus vähemalt väikseimal ja suurimal katses kasutataval kontsentratsioonil, kuid soovitatavalt igal katsekontsentratsioonil. Poolstaatilises (uuendamisega) katses, kus uuritava kemikaali sisaldus püsib eeldatavalt vahemikus ± 20 % nominaalväärtusest, soovitatakse seda analüüsida vähemalt suurimal ja väikseimal katsekontsentratsioonil pärast värske lahuse valmistamist ja vahetult enne lahuse uuendamist. Katsete puhul, kus uuritava kemikaali sisaldus ei püsi eeldatavalt vahemikus ± 20 % nominaalväärtusest, tuleb seda analüüsida kõikidel katsekontsentratsioonidel pärast värske lahuse valmistamist ja vahetult enne lahuse uuendamist. Kui lahust ei ole analüüsimiseks piisavalt, võib olla kasu katselahuste ühtekoondamisest või selliste asenduskambrite kasutamisest, mis on samast materjalist kui 24-kannulised plaadid ja millel on sama ruumala ja pindala suhe. On tungivalt soovitatav, et tulemused põhineksid mõõdetud kontsentratsioonidel. Kui kontsentratsioonid ei püsi vahemikus 80–120 % nominaalväärtusest, tuleks mõju avaldumise kontsentratsioone väljendada kontsentratsiooni mõõdetud väärtuste geomeetrilise keskmise suhtes; seda on üksikasjalikumalt kirjeldatud OECD juhenddokumendi „Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“ („Raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimine“) (28) 5. peatükis.

PIIRSISALDUSKATSE

37. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud korra alusel võib teha piirsisalduskatse uuritava kemikaali kontsentratsioonil 100 mg/l või katsekeskkonnas lahustuvuse piirkontsentratsioonil (olenevalt sellest, kumb neist on väiksem) ja selle abil tõendada, et kemikaali LC_{50} on sellest kontsentratsioonist suurem. Piirsisalduskatses tuleks kasutada nii katserühma kui ka positiivse kontrolli ja vajaduse korral lahustiga kontrolli puhul 20 embrüot ning negatiivse kontrolli puhul 24 embrüot. Kui suremuse määr katses kasutatud kontsentratsioonil on vähemalt 10 % suurem kui negatiivse (või lahustiga) kontrolli puhul, tuleks läbi viia täismahus uuring. Mis tahes täheldatud mõju tuleks

▼M7

registreerida. Kui negatiivse (või lahustiga) kontrolli puhul on suremus suurem kui 10 %, loetakse katsetulemused kehtetuks ja katset tuleks korrata.

ANDMED JA ARUANDLUS

Andmete töötlemine

38. Käesoleva katsemeetodi puhul käsitletakse iga üksikut kannu statistilises analüüsis sõltumatu paralleelproovina. Selliste embrüote protsentuaalne osakaal, mille puhul vähemalt ühe lõppnäitaja vaatluse tulemus on 48 ja/või 96 tunni möödudes positiivne, kantakse graafikule sõltuvuses katsekontsentratsioonist. Saadud kõvera tõusude, LC_{50} ja usaldusnivoole 95 % vastavate usalduspiiride arvutamiseks tuleks kasutada sobivaid statistikameetodeid (38) ja tutvuda OECD juhenddokumendiga „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data“ („Praegused meetodid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks“) (39).

Katseprotokoll

39. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal:

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus, nt koostisosade keemiline määratlus (vt eespool), kvantitatiivne sisaldus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused.

Katseorganismid:

— teaduslik nimetus, liin, päritolu ning viljastatud marjaterade kogumise ja järgneva käitlemise meetod.

Katsetingimused:

— kasutatud katserežiim (nt uuendamisega poolstaatiline režiim);

— valgustusperiood;

— katseplaan (nt katsekambrite arv, kontrollide liigid);

— vee kvaliteedinäitajad kalade pidamisel (nt pH, karedus, temperatuur, juhtivus, lahustunud hapniku sisaldus);

— lahustunud hapniku sisaldus, pH, üldkaredus, temperatuur ja juhtivus katselahustes katse alguses ja 96 tundi hiljem;

— põhilahuste ja katselahuste valmistamise meetod ning lahuse uuendamise sagedus;

▼M7

— lahusti kasutamise põhjendus ja lahusti valiku põhjendus, kui lahustina ei kasutata vett;

— nominaalsed katsekontsentratsioonid ja kõik katsenõudes oleva uuritava kemikaali sisalduse määramise tulemused; tuleks esitada ka meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja määramispiir;

— tõendid selle kohta, et üldist elulemust käsitlevad nõuetekohasuse kriteeriumid on kontrollrühmades täidetud;

— marjaterade viljastamise määr;

— koorumise määr katse- ja kontrollrühmades.

Tulemused:

— suurim kontsentratsioon, mille puhul katse vältel ei täheldata suremust;

— väikseim kontsentratsioon, mille puhul suremus katse vältel on 100 %;

— kumulatiivne suremus soovitatavatel vaatlusaegadel iga kontsentratsiooni juures;

— suremuse näitajana LC_{50} väärtus 96 tunni (ja soovi korral 48 tunni) möödudes, võimaluse korral koos usalduspiiridega usaldusnivool 95 %;

— kontsentratsiooni ja katse lõpuks täheldatava suremuse vahelise sõltuvuse graafik;

— suremus kontrollrühmades (negatiivne kontroll, plaadisisesed kontrollid, positiivne kontroll ja lahusti kasutamisel lahustiga kontroll);

— kõigi nelja lõppnäitaja vaatluse tulemusi kajastavad andmed;

— võimalike morfoloogiliste ja füsioloogiliste kõrvalekallete esinemissagedus ja kirjeldus (näited on esitatud 5. liite joonisel 2);

— katse käigus esinenud vahejuhtumid, mis võisid mõjutada tulemusi;

— andmete statistiline analüüs ja töötlemine (probitanalüüs, logistilise regressiooni mudel ja geomeetriline keskmine seoses LC_{50}-ga);

— kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse (teisendatud) kõvera regressioonisirge tõus ja usalduspiirid.

Kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja sellekohased selgitused.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine.

KIRJANDUS

(1) OECD (2011). Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157. OECD, Pariis.

(2) OECD (2012). Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179. OECD, Pariis.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., ja Seitz, N. (2005). Towards an alternative for the acute fish

▼M7

LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. ALTEX 22: 87–102.

(4) ISO (2007). International Standard. Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E). Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon.

(5) Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38–48.

(6) Schulte, C., ja Nagel, R. (1994). Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22: 12–19.

(7) Bachmann, J. (2002). Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Doktoritöö. Dresdeni Tehnikaülikool, Saksamaa.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J., ja Nagel, R. (1995). Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30 (11): 2087–2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F. J. M., Rico-Rico, A., Kramer, N. I., Hermens, J. L. M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., ja Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ. Sci. Technol.* 46: 9690–9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M., ja Wosniok, W. (2006). Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. *Arch. Environ. Con. Tox.* 51: 97–102.

(11) Groth, G., Kronauer, K., ja Freundt, K. J. (1994). Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. *Toxicol. In Vitro* 8: 401–406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V., ja Freundt, K. J. (1993). Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. *B. Environ. Contam. Tox.* 50: 878–882.

(13) Nguyen, L. T., ja Janssen, C. R. (2001). Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 16: 566–571.

(14) Cheng, S. H., Wai, A. W. K., So, C. H., ja Wu, R. S. S. (2000). Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 3024–3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings, J. M., ja Carr, G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 32: 1768-1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., ja Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Phys. C* 149 (2): 196–209.

(17) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine“.

(18) Käesoleva lisa peatükk C.29 „Kiire biolagundatavus – CO_2 suletud nõudes (vabaruumi katse)“.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., ja Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25–36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., ja Broschard, T. H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133–141.

(21) Incardona, J. P, Linbo, T. L., ja Scholz, N. L. (2011). Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharm.* 257: 242–249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J. J., Woodin, B. R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R. E., Hiraga, T., ja Teraoka, H. (2011). Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharm.* 253: 244–252.

(23) Käesoleva lisa peatükk C.48 „Lühiajaline kalade paljunemise katse“. Vt 4A liide.

(24) Lammer, E., Kamp, H. G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E. R., Wendlar, K., Zok, S., ja Braunbeck, T. (2009). Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. In Vitro* 23: 1436–1442.

(25) Brown, R. S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I. S., Villerius, L. A., ja Klamer, H. J. C. (2001). Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., ja Küster, E. (2008). How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 1676–1682.

(27) ISO (1996). International Standard. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Kättesaadav aadressil http://www.iso.org.

(28) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Pariis.

(29) Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121–173.

(30) Westerfield, M. (2007). The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5. väljaanne. Neuroteaduste instituut, Oregoni Ülikool. University of Oregon Press, Eugene, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005). Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing. ISBN: 0-919087-43-4. http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Euroopa Komisjon (2007). Komisjoni soovitus 2007/526/EÜ, 18. juuni 2007, teaduslikes katsetes ja muudel teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade pidamise ja hooldamise suuniste kohta (teatavaks tehtud numbri K(2007) 2525 all) (http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:ET:PDF).

(33) Euroopa Liit (2010). Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta. *Euroopa Liidu Teataja* L 276, 20.10.2010, lk 33.

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:ET:PDF

(34) Nagel, R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). *J. Appl. Ichthyol.* 2: 173–181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., ja Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* 203: 253–310.

(36) Käesoleva lisa peatükk C.2 „*Daphnia* sp. liikumisvõime akuutse pärssimise katse“.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., ja Duis, K. (2009). Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1970–1978.

(38) ISO (2006). International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data. ISO TS 20281. Kättesaadav aadressil http://www.iso.org.

(39) OECD (2006). Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariis.

(40) Braunbeck, T., ja Lammer, E. (2006). Põhjalik ülevaateartikkel „Fish embryo toxicity assays“. UBA aruanne lepingu nr 20385422 raames. Saksamaa Keskkonnaamet, Berliin. 298 lk.

▼M7

1. liide

MÕISTED

Lõppnäitaja – näitaja, mis iseloomustab mõju populatsiooni tasandil.

Blastula – animaalsel poolusel paiknev rakukogum, mis katab teatava osa rebust.

Kemikaal – aine või segu.

Epiboolia – peamiselt epidermaalsete rakkude massiline paljunemine embrüo arengu gastrulatsioonietapis ja nende rakkude liikumine dorsaalselt küljelt ventraalsele; selle käigus sopistub endodermaalne rakukiht invaginatsiooni meenutava protsessi tagajärjel sisse ja rebu haaratakse embrüo koosseisu.

Läbivoolukatse – katse, mille puhul katselahused voolavad kokkupuuteperioodi vältel pidevalt läbi katsesüsteemi.

Plaadisisene kontroll – sisemine kontroll, mis hõlmab 24-kannulisel plaadil lahjendusveega täidetud 4 kannu ning võimaldab tuvastada plaadi võimalikku saastumist tootja või katset tegeva teadlase süül ja plaadiga seotud mis tahes võimalikku mõju katsetulemustele (nt temperatuurigradient).

IUPAC – Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit.

Kalade pidamise vesi – vesi, mida kasutatakse täiskasvanud kalade pidamiseks.

Letaalne mediaankontsentratsioon (LC_{50}) – uuritava kemikaali hinnanguline kontsentratsioon, mille juures kemikaal on katse vältel letaalne 50 protsendile katseorganismidest.

Poolstaatiline uuendamisega katse – katse, mille käigus katselahuseid uuendatakse korrapäraselt kindlaksmääratud ajavahemike (nt iga 24 tunni) järel.

SMILES – *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* (lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem).

Somiit – selgroogsete embrüo arengus on somiidid neuraaltoru külgedel paiknevad mesodermaalsed rakumassid, millest lõpuks arenevad pärisnahk (dermatoom), skeletilihased (müotoom) ja selgroolülid (sklerotoom).

Staatiline katse – katse, mille puhul katselahuseid katse käigus ei uuendata.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

▼M7

2. liide

KALADE PIDAMINE JA KASVATAMINE NING VÖÖDILISE DAANIO EMBRÜOTEGA TEHTAVA ÄGEDA MÜRGISUSE KATSE TAVAPÄRASED TINGIMUSED

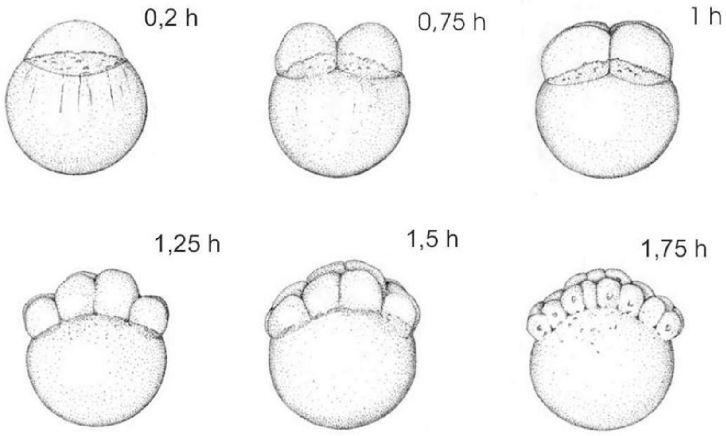
Vöödiline daanio (*Danio rerio*)

Liigi päritolu		India, Birma, Malaka, Sumatra
Sooline dimorfism		Emased: esileulatuv kõht marja kandmise ajal Isased: saledamad, oranži värvusega siniste pikitriipude vahel (eriti selgelt nähtav pärakuuime juures)
Söötmisrežiim		Kuiv helvessööt 3–5 korda päevas (maksimaalselt 3 % kala kehamassist päevas); täiendavalt soolase vee krevettide (*Artemia* sp.) noorjärgus isendid ja/või saastumata allikast pärit sobiva suurusega väikesed kiivrikud. Elussööt on keskkonda rikastav ja seepärast tuleks seda võimaluse korral alati anda. Optimaalse veekvaliteedi tagamiseks tuleks sööda ülejääk ja väljaheited eemaldada umbes üks tund pärast söötmist.
Täiskasvanud kala ligikaudne mass		Emased: 0,65 ± 0,13 g Isased: 0,5 ± 0,1 g
Sugukalade pidamine	Valgustus	Luminofoorlambid (laia spektriga); 10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1080 luksi või 50-100 ft-c (labori üldvalgustus); valgustusperiood 12–16 tundi
	Vee temperatuur	26 ± 1 °C
	Vee kvaliteet	O_2 sisaldus: ≥ 80 % küllastuskontsentratsioonist; karedus: nt ~ 30–300 mg $CaCO_3$ liitri kohta; NO_3^- sisaldus: ≤ 48 mg/l; NH_4^+ ja NO_2^- sisaldus: < 0,001 mg/l; kloorijääkide sisaldus: < 10 µg/l; orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus: < 25 ng/l; pH: 6,5–8,5
	Täiendavad vee kvaliteedi kriteeriumid	Tahkete osakeste sisaldus < 20 mg/l, orgaanilise süsiniku üldsisaldus < 2 mg/l, fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus <50 ng/l, kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus < 50 ng/l
	Kalade pidamiseks kasutatava akvaariumi suurus	Nt 180 liitrit; 1 kala liitri kohta
	Veepuhastus	Pidev (söefiltri abil); muu võimalusena võib seda kombineerida perioodilisel uuendamisel põhineva poolstaatilise süsteemi või vee pideval uuendamisel põhineva läbivoolusüsteemiga
	Soovitatav isas- ja emaskalade suhtarv kudemisel	2:1 (või masskudemine)
Kudemisnõud		Nt 4-liitrised nõud, mille põhjas on terasvõrk ja mis sisaldavad kudemise soodustamiseks kunsttaimi; välised soojendusmatid või masskudemine kalade pidamiseks kasutatavates akvaariumides
Marjaterade struktuur ja välimus		Stabiilne koorion (st väga läbipaistev, mittekleepuv, läbimõõduga ~ 0,8–1,5 mm)
Kudemismäär		Üks suguküps emaskala koeb vähemalt 50–80 marjatera päevas. Kalaliinist sõltuvalt võib kudemismäär olla oluliselt suurem. Viljastamismäär peaks olema ≥ 70 %. Esmakordselt kudevate kalade puhul võib marjaterade viljastamise määr paaril esimesel kudemisel olla väiksem.
Katse tüüp		Staatiline, uuendamisega poolstaatiline või läbivoolukatse, 26 ± 1 °C, 24 tunni vältel katsetingimustega kohandatud katsekambrid (nt 24-kannulised plaadid, 2,5–5 ml lahust kannu kohta)

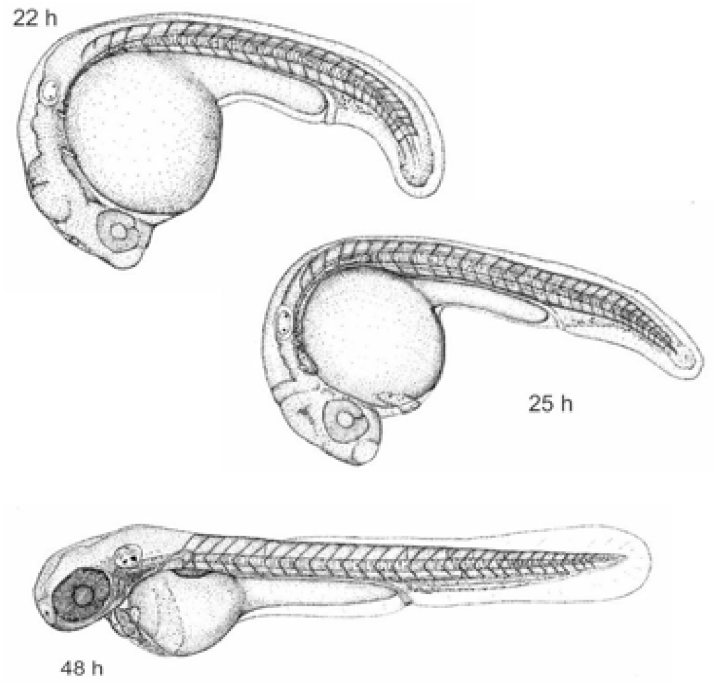
▼M7

3. liide

VÖÖDILISE DAANIO NORMAALNE ARENG TEMPERATUURIL 26 °C

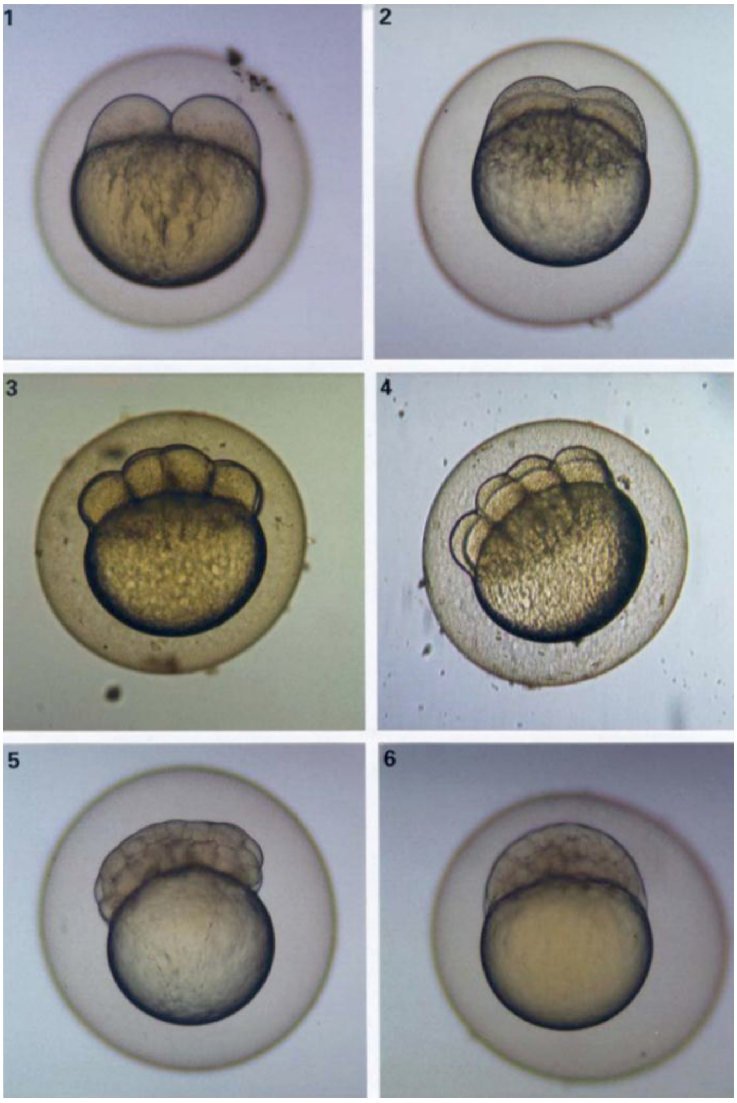


Joonis 1. Vöödilise daanio (*Danio rerio*) varase arengu valitud etapid: 0,2–1,75 tundi pärast viljastamist (allikas: Kimmel *et al*., 1995 (35)). Normaalse arengu sündmuste ajalist järgnevust võib kasutada nii marjaterade viljastamise kui ka nende elujõulisuse hindamiseks (viljastatud marjaterade valimist on käsitletud punktis 26).



Joonis 2. Vöödilise daanio (*Danio rerio*) hilised valitud arenguetapid (embrüolt on nähtavuse parandamiseks eemaldatud koorion): 22–48 tundi pärast viljastamist (allikas: Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼**M7**



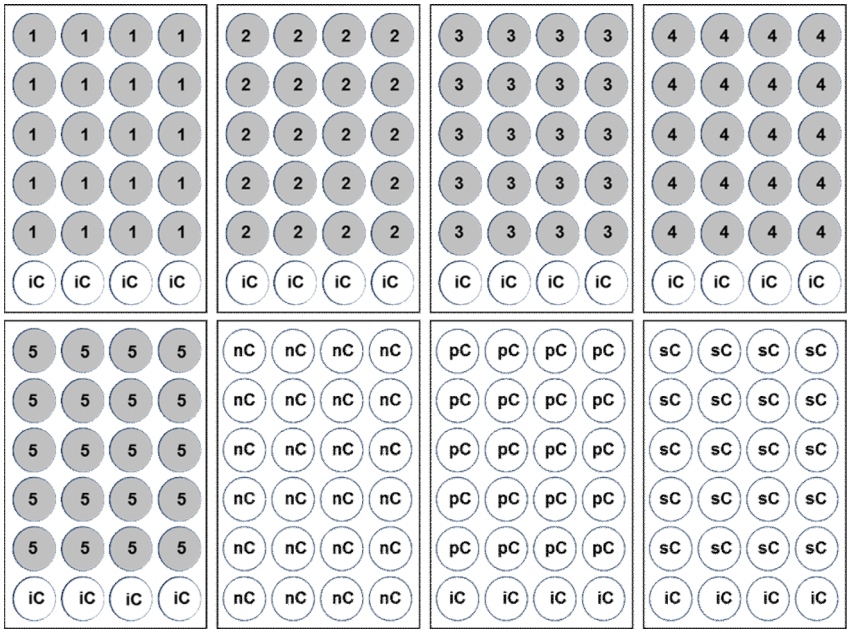
Joonis 3. Vöödilise daanio (*Danio rerio*) embrüo normaalne areng: 1) 0,75 tunni pärast, kaherakuline staadium; 2) 1 tunni pärast, neljarakuline staadium; 3) 1,2 tunni pärast, kaheksarakuline staadium; 4) 1,5 tunni pärast, 16-rakuline staadium; 5) 4,7 tunni pärast, epiboolia algus; 6) 5,3 tunni pärast, epiboolia on umbes 50 % ulatuses ära toimunud (allikas: Braunbeck ja Lammer, 2006 (40)).

▼M7

4. liide

Joonis 1

Jaotusskeem 24-kannulisel plaadil



1–5 = viis katsekontsentratsiooni kemikaali kohta;

nC = negatiivne kontroll (lahjendusvesi);

iC = plaadisisene kontroll (lahjendusvesi);

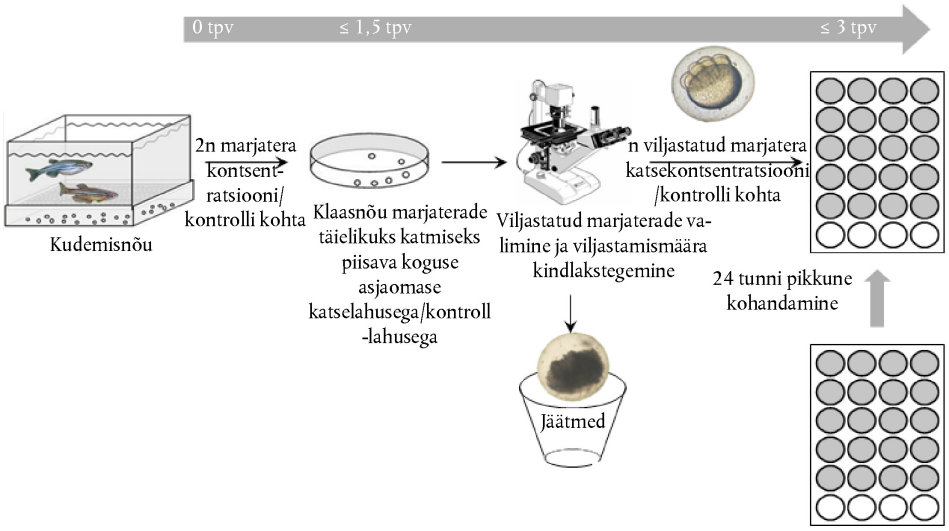
pC = positiivne kontroll (3,4-dikloroaniliin, 4 mg/l);

sC = lahustiga kontroll

▼M7

Joonis 2

Vöödilise daanio embrüotega tehtava ägeda mürgisuse katse skeem (vasakult paremale): marja heitmine, marjaterade kogumine, kokkupuute-eelne periood klaasnõudes vahetult pärast viljastamist, viljastatud marjaterade valimine invertmikroskoobi või binokulaarmikroskoobi abil ja nende jaotamine 24-kannulistele plaatidele, kuhu on eelnevalt lisatud asjakohase kontsentratsiooniga katselahus või kontroll-lahus; n – vajalik marjaterade arv katsekontsentratsiooni/kontrolli kohta (siin 20), tpv – tundi pärast viljastamist.



▼M7

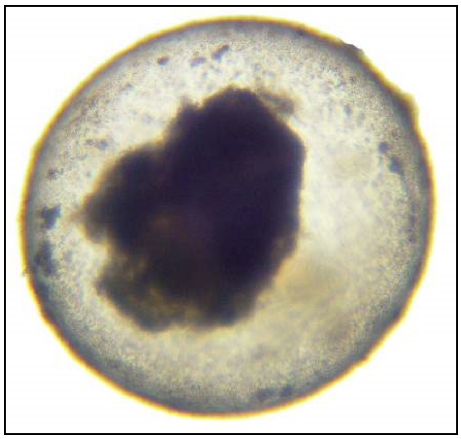
5. liide

VÖÖDILISE DAANIO EMBRÜOTEGA TEHTAVAS ÄGEDA MÜRGISUSE KATSES TÄHELDATAVA LETAALSE MÕJU LÕPPNÄITAJATE ATLAS

Ägedale mürgisusele ja sellest tulenevale embrüo surmale viitavad järgmised lõppnäitajad: *embrüo koaguleerumine, saba eraldumata jäämine, somiitide moodustumata jäämine ja südamelöökide puudumine*. Nende lõppnäitajate illustreerimiseks on valitud järgmised mikrograafid.

Joonis 1

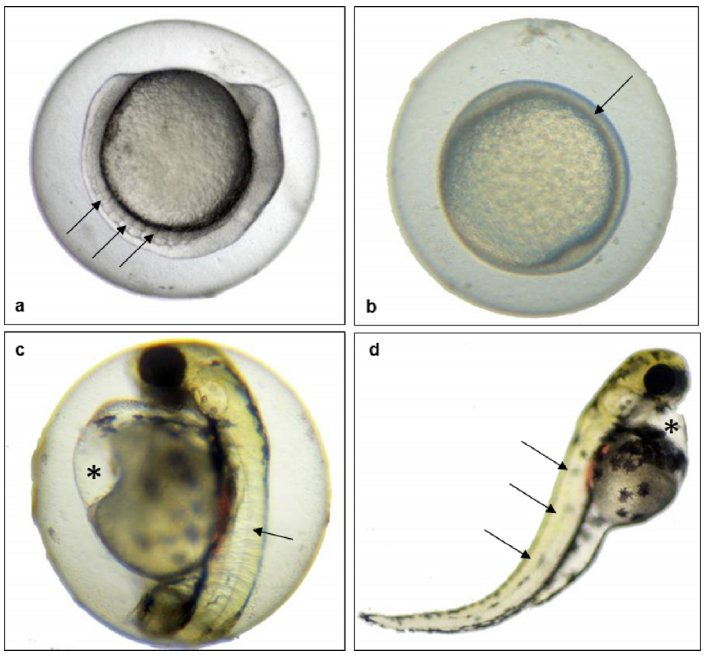
Embrüo koaguleerumine:



vöödilise daanio koaguleerunud embrüotel täheldatakse helevälja meetodil valgustamisel mitmesuguseid läbipaistmatuid inklusioone.

Joonis 2

Somiitide moodustumata jäämine:

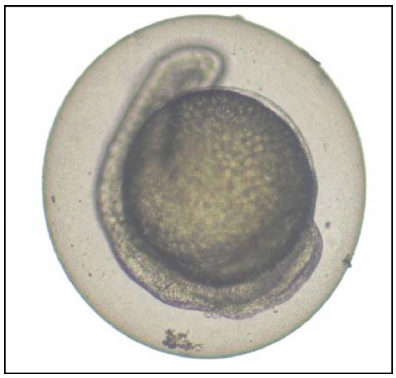


▼M7

ehkki pildil a kujutatud 24 tunni vanune vöödilise daanio embrüo on arengus umbes 10 tundi maha jäänud, on sellel näha hästi välja kujunenud somiidid (→), kuid pildil b kujutatud embrüo puhul ei esine mingeid märke somiitide moodustumisest (→). Ehkki pildil c kujutatud 48 tunni vanusel vöödilise daanio embrüol võib täheldada silmatorkavat rebukoti turset (*), on sellel moodustunud selgelt eristatavad somiidid (→), kuid pildil d kujutatud 96 tunni vanuse embrüo puhul ei esine mingeid märke somiitide moodustumisest (→). Samuti tuleks tähele panna pildil d kujutatud embrüo selgroo kõverust (skolioos) ja perikardi turset (*).

Joonis 3

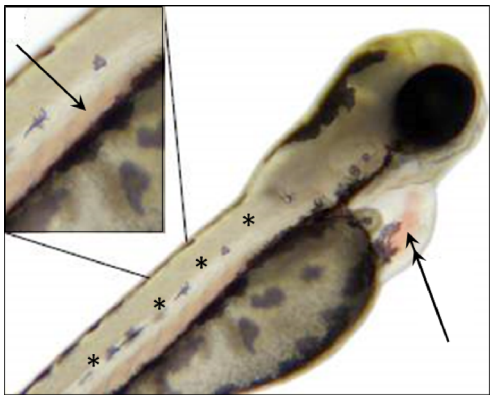
Sabaalgme eraldumata jäämine külgvaates



(a: →; 96 tunni vanune vöödilise daanio embrüo). Tuleks tähele panna ka silmaalgme puudumist (*).

Joonis 4

Südamelöökide puudumist



Südamelöökide puudumist on määratlusest tulenevalt keeruline mikrograafil kujutada. Südamelöökide puudumisele viitab südame (topeltnool) kokkutõmmete puudumine. Vererakkude liikumatus näiteks kõhuaordis (→ suurendatud pildil) ei ole südamelöökide puudumise näitaja. Samuti tuleks tähele panna somiitide puudumist kujutatud embrüol (*; lihaskude on homogeenne, mitte segmenteerunud). Südamelöökide puudumise registreerimiseks tuleks embrüot vaadelda vähemalt 80-kordsel suurendusel vähemalt ühe minuti vältel.

▼M7

C.50. **Settevaba mürgisuskatse *Myriophyllum spicatum*'iga**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 238 (2014). Selle abil on võimalik hinnata kemikaalide mürgisust perekonda vesikuusk kuuluvale kaheidulehelisele veesisesele liigile *Myriophyllum spicatum*. Meetod põhineb olemasoleval ASTMi katsemeetodil (1), mida on kohandatud settevabas katsesüsteemis kasutamiseks (2), et võimaldada hinnata uuritava kemikaali tegelikku ökotoksilisust (olenemata kemikaali vee ja sette vahel jaotumise näitajatest). Setteta katsesüsteemis on analüüsimine hõlbus (üksnes veefaasis) ja tulemusi on võimalik vaadelda paralleelselt ja/või võrdluses *Lemna* sp. põhise katse tulemustega (3); peale selle võimaldavad nõutavad steriilsed tingimused tagada, et mikroorganismide ja vetikate mõju (kemikaali omastamine/lagundamine jne) on võimalikult väike. Käesolev katsemeetod ei asenda muid veekeskkonnas avalduva mürgisuse hindamise meetodeid, vaid pigem täiendab neid ja võimaldab täielikumalt hinnata ohte ja riske veetaimedele. Käesolev meetod on valideeritud võrdlusuuringuga (4).

2. Meetodis kirjeldatakse katse üksikasju uuendatava katselahuse (poolstaatiline režiim) ja mitteuuendatava katselahuse (staatiline režiim) kasutamisel. Olenevalt katse eesmärgist ja regulatiivsetest nõuetest on soovitatav kasutada poolstaatilist režiimi näiteks selliste ainete puhul, mis kaovad lahusest kiiresti lendumise, adsorbeerumise, fotolagunemise, hüdrolüüsumise, sadenemise või biolagunemise tõttu. Täiendavad juhised on esitatud viites 5. Käesolevat katsemeetodit kohaldatakse ainete puhul, mille jaoks see on valideeritud (üksikasjalik teave on esitatud võrdlusuuringu aruandes (4)), ning valmististe ja teadaolevate segude puhul; segu analüüsimisel peaksid selle koostisosad olema võimalikult suures ulatuses määratletud ja kvantifitseeritud. Käesolev *Myriophyllum spicatum*'il põhinev settevaba katsemeetod täiendab *Myriophyllum spicatum*'ile süsteemis vesi/sete avalduva mürgisuse hindamise meetodit (6). Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks regulatiivsel eesmärgil tuleks kaaluda, kas ja kuidas see meetod võimaldab saada taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused. Seda ei ole vaja kaaluda, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

KATSE PÕHIMÕTE

3. Pidevalt kasvavatel *Myriophyllum spicatum*'i taimedel (kasutatakse üksnes muudetud Andrewsi söödet; vt 2. liide) lastakse kasvada settevabas katsesüsteemis monokultuurina 14 päeva eri kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Katse eesmärk on kirjeldada valitud mõõdetava muutuja alusel kvantitatiivselt kemikaali mõju vegetatiivsele kasvule nimetatud perioodi jooksul. Mõõdetavad muutujad on võrsete, külgharude ja juurte pikkus, samuti märgmass ja kuivmass ning männaste arv. Peale selle võetakse arvesse katseorganismidel täheldatavaid spetsiifilisi kvalitatiivseid muutusi, näiteks väliseid moonutusi, kloroosi ja nekroosi, millele viitab kolletumine või valge-pruunikirju värvus. Kemikaali mõju kvantitatiivseks hindamiseks võrreldakse kasvu katselahuses kasvuga kontrollrühmas ning tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures kasv pidurdub teatud kindla protsendi x võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul EC_x, kus x võib olla regulatiivsetest nõuetest sõltuvalt mis tahes väärtusega – nt EC_{10}, EC_{20} või EC_{50}. Tuleks tähele panna, et EC_{10} ja EC_{20} hinnanguline väärtus on usaldusväärne ja asjakohane üksnes sellise katse puhul, kus kontrolltaimi iseloomustav variatsioonikordaja on hinnatava mõju ulatusest väiksem; see tähendab, et EC_{20} usaldusväärseks hindamiseks peaks variatsioonikordaja olema < 20 %.

4. Töödeldud ja töötlemata taimedel tuleks määrata nii keskmine kasvu erikiirus kui ka saagis (kumbagi näitajat hinnatakse peavõrse pikkuse ja kolme täiendava mõõdetava muutuja alusel). Leitud kasvu erikiirust (r) ja saagist (y)

▼M7

kasutatakse vastavalt E_rC_x (nt E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) ja E_yC_x (nt E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) määramiseks.

5. Peale selle võib statistiliselt kindlaks teha vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni ja täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni.

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

6. Analüüsimeetod uuritava kemikaali sisalduse määramiseks katsesöötmes peaks olema piisava tundlikkusega. Katsetingimuste kindlaksmääramiseks võib uuritava kemikaali kohta olla kasulik teada muu hulgas järgmisi andmeid: struktuurivalem, puhtus ja lisandid, lahustuvus vees, püsivus vees ja valguse käes, happe dissotsiatsioonikonstant (pK_a), jaotuskoefitsient süsteemis oktanool/vesi (K_{ow}), aururõhk ja biolagundatavus. Vees lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas uuritava kemikaali märkimisväärne kadu katse ajal on tõenäoline. See aitab kindlaks teha, kas sellise kao ärahoidmiseks tuleks võtta konkreetseid meetmeid. Kui puuduvad kindlad andmed uuritava kemikaali lahustuvuse ja püsivuse kohta, soovitatakse hinnata neid omadusi katses kasutatavates tingimustes, st samas söötmes ning sama temperatuuri ja valgusrežiimi juures.

7. Katsesöötme pH reguleerimine on eriti oluline näiteks juhul, kui analüüsitakse metalle või kergesti hüdrolüüsuvaid aineid. Täiendavad juhised selliste kemikaalide mõju hindamiseks, mille füüsikalis-keemilised omadused raskendavad nende uurimist, on esitatud asjaomases OECD juhenddokumendis (5).

KATSE NÕUETEKOHASUS

8. Katse vastab nõuetele, kui peavõrse pikkuse kahekordistumise aeg kontrollrühmas on lühem kui 14 päeva. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud söötmete ja katsetingimuste kasutamisel on see kriteerium täidetav nii staatilise kui ka poolstaatilise katserežiimi puhul.

9. Võrsete märgmassi (st katse alguses ja katse lõpus saadud väärtuste) ja täiendavate mõõdetud näitajate (vt punkt 37) alusel arvutatud saagise keskmine paralleelkultuuride vaheline variatsioonikordaja ei tohi kontrollrühmas olla suurem kui 35 %.

10. Kontrollrühmas peavad üle 50 % paralleelkultuuridest püsima 14 päeva pikkuse kokkupuuteperioodi vältel steriilsena, st need ei tohi olla nähtavalt saastunud muude organismidega, näiteks vetikate, seente või bakteritega (selge lahus). *Märkus*: steriilsuse hindamise juhised on esitatud võrdlusuuringu aruandes (4).

VÕRDLUSKEMIKAAL

11. Katsemeetodi kontrollimiseks võib kasutada ühte või mitut võrdluskemikaali, näiteks võrdlusuuringus (4) kasutatud 3,5-diklorofenooli; võrdlusuuringu andmete põhjal jäävad 3,5-diklorofenooli EC_{50} keskväärtused eri uuritavate muutujate puhul (vt käesoleva katsemeetodi punktid 37–41) vahemikku 3,2–6,9 mg/l (üksikasjalik teave nende väärtuste usaldusvahemiku kohta on esitatud võrdlusuuringu aruandes). Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas või kui katseid tehakse harvem, siis uuritava kemikaali mürgisuse määramisega samaaegselt.

▼M7

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

12. Kõik katsesöötmega kokku puutuvad seadmed peaksid olema klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Kultuuride kasvatamiseks ja katseteks kasutatavad klaasnõud peaksid olema steriilsed ja katsesöötmesse leostuda võivatest keemilistest saasteainetest puhastatud. Katsenõud peavad olema piisavalt kõrged, et kontrollnõudes olevad võrsed saaksid kasvada veefaasis ega jõuaks katse lõpuks katsesöötme pinnale. Soovitatakse kasutada servarandita ja alumiiniumkorgiga paksuseinalisi boorsilikaatklaasist katseklaase siseläbimõõduga umbes 20 mm ja pikkusega umbes 250 mm.

13. Kuna muudetud Andrewsi sööde sisaldab sahharoosi (mis soodustab seente ja bakterite kasvu), tuleb katselahused valmistada steriilsetes tingimustes. Enne kasutamist steriliseeritakse kõik vedelikud ja seadmed. Selleks töödeldakse neid 4 tunni vältel kuuma õhuga (210 °C) või autoklaavitakse 20 minutit 121 °C juures. Peale selle töödeldakse kõiki kolbe, nõusid, kausse jms ning muid seadmeid vahetult enne kasutamist steriilsel töölaual leegiga.

14. Kultuure ja katsenõusid ei tohiks hoida koos. Seepärast on kõige parem kasutada eraldi kasvukambreid, inkubaatoreid või ruume. Valgustihedus ja temperatuur peaksid olema reguleeritavad ja neid tuleks hoida konstantsena.

Katseorganism

15. *Myriophyllum spicatum* – veesisene kaheiduleheline liik – kuulub perekonda vesikuusk. Ajavahemikul juunist augustini ilmuvad veepinna kohale silmatorkamatud roosakasvalged õied. Taimed on juurdunud tugevate risoomide süsteemi abil ja neid võib leida kogu põhjapoolkeral eutroofsetes, kuid saastumata ja lubjarikkamates mudase põhjaga seisuveekogudes. *Myriophyllum spicatum* eelistab magevett, kuid võib esineda ka riimvees.

16. Settevaba mürgisuskatse jaoks on vaja steriilseid taimi. Kui laboris, kus katset tehakse, ei kultiveerita tavaliselt *Myriophyllum spicatum*'it, võib steriilse taimse materjali saada mõnest muust laborist või hankida (mittesteriilsed) taimed loodusest või kaubandusliku tarnija käest; kui taimed saadakse loodusest, tuleks ette näha liigilise kuuluvuse kontrollimine. Loodusest kogutud või kaubanduslikult tarnijalt saadud taimed tuleks enne kasutamist steriliseerida (1) ja kultiveerida neid vähemalt kaheksa nädalat katses kasutatavas söötmes. Loodusliku lähtekultuuri kogumiskohas ei tohi esineda ilmseid saasteallikaid. *Myriophyllum spicatum*'i kogumisel loodusest tuleks hoolega jälgida, et võetakse õige liigi taimed, eriti piirkonnas, kus see liik võib hübridiseeruda teiste *Myriophyllum*'i liikidega. Teisest laborist saadud taimi tuleks enne kasutamist kultiveerida samal viisil vähemalt kolm nädalat. Taimse materjali allikas ning katses kasutatud liik tuleks alati märkida katseprotokolli.

17. Katses kasutatavate taimede kvaliteet ja ühetaolisus mõjutavad märkimisväärselt katsetulemust ning seepärast tuleks taimi hoolikalt valida. Tuleks kasutada kiirelt kasvavaid noori taimi, millel pole nähtavaid kahjustusi ega värvimuutusi (kloroos). Katseorganismi ettevalmistamist on üksikasjalikult kirjeldatud 4. liites.

Kultiveerimine

18. Kultuuride hooldamissageduse vähendamiseks (nt kui teatava aja jooksul ei kavandata katseid vesikuusega) võib kultuure hoida vähendatud valgustiheduse ja madalama temperatuuri juures (50 µE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). Kultiveerimist on üksikasjalikult kirjeldatud 3. liites.

▼M7

19. Vähemalt 14–21 päeva enne katset viiakse piisav arv katseorganisme aseptiliselt värskesse steriilsesse söötmesse ja neid kasvatatakse katsetingimustes eelkultuurina 14–21 ööpäeva. Eelkultuuri loomist on üksikasjalikult kirjeldatud 4. liites.

Katsesööde

20. Settevabas katsesüsteemis soovitatakse kasutada *Myriophyllum spicatum*'i jaoks ainult ühte söödet, nagu on kirjeldatud 2. liites. *Myriophyllum spicatum*'i kultiveerimiseks ja sellega katsete tegemiseks on soovitatav kasutada muudetud Andrewsi söödet, nagu on kirjeldatud viites 1. Muudetud Andrewsi sööde saadakse viiest eraldi valmistatud toitainete põhilahusest, millele lisatakse 3 % sahharoosi. Söötme valmistamist on üksikasjalikult kirjeldatud 2. liites.

21. Katselahuste valmistamiseks (asjakohase lahjendamise teel) on vajalik kümnekordselt kontsentreeritud muudetud Andrewsi sööde. Selle söötme koostis on esitatud 2. liites.

Katselahused

22. Katselahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Uuritava kemikaali põhilahuse valmistamiseks lahustatakse kemikaal tavaliselt demineraliseeritud (st destilleeritud või deioniseeritud) vees. Toitainete lisamiseks kasutatakse kümnekordselt kontsentreeritud muudetud Andrewsi söödet.

23. Uuritava kemikaali põhilahuse võib steriliseerida autoklaavimisega 20 minuti jooksul 121 °C juures või filtrimise teel, eeldusel, et uuritav kemikaal kasutatava steriliseerimismeetodi puhul ei denatureeru. Katselahused võib valmistada ka steriilse demineraliseeritud vee või söötmega steriilsetes tingimustes. Uuritava kemikaali põhilahuse steriliseerimise meetodi valikul tuleks arvesse võtta kemikaali termilist püsivust ja adsorbeerumist eri pindadele. Seepärast on soovitatav valmistada põhilahus steriilsetes tingimustes, st lahustada uuritav kemikaal steriilsete materjalide abil steriilsetes tingimustes (nt leegis steriliseerimine, laminaarkapp vms) steriilses vees. Kõnealune steriilse põhilahuse valmistamise meetod on rakendatav nii ainete kui ka segude puhul.

24. Üldjuhul ei tohiks uuritava kemikaali suurim kasutatav kontsentratsioon ületada kemikaali vees lahustuvuse piirkontsentratsiooni katsetingimustes. Vees raskesti lahustuva kemikaali puhul võib olla vaja kasutada selle kemikaali kontsentreeritud põhilahuse või dispersiooni valmistamiseks orgaanilist lahustit või dispergeerivat ainet, et hõlbustada uuritava kemikaali täpse koguse lisamist katsesöötmesse ja soodustada kemikaali lahustumist või dispergeerumist. Tuleks teha kõik selleks, et selliseid aineid ei oleks vaja kasutada. Lisatav lahusti või dispergeeriv aine ei tohiks olla fütotoksiline. Tavaliselt kasutatavad lahustid, mis kuni kontsentratsioonini 100 µl/l ei ole fütotoksilised, on näiteks atsetoon ja dimetüülformamiid. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamisel peaks selle lõppsisaldus olema võimalikult väike (≤ 100 µl/l) ja tuleks märkida katseprotokolli ning kõigi katse- ja kontrollkultuuride puhul tuleks kasutada lahusti või dispergeeriva aine ühesugust kontsentratsiooni. Täiendavad juhised dispergeeriva aine kasutamise kohta on esitatud viites 5.

Katse- ja kontrollrühmad

25. Uuritava kemikaali sobivate kontsentratsioonide valimine on hõlpsam, kui kemikaali mürgisus *Myriophyllum spicatum*'ile on kontsentratsioonivahemiku leidmise katsega eelnevalt kindlaks tehtud. Lõplikus mürgisuse hindamise katses tuleks üldjuhul kasutada viit (nagu käesoleva lisa peatükis C.26 kirjeldatud *Lemna* kasvu pidurdumise katses) kuni seitset katsekontsentratsiooni geomeetrilises jadas; kõnealune kontsentratsioonivahemik tuleks valida nii, et see

▼M7

hõlmaks täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni ja EC_{50}. Katsekontsentratsioonide jada tegur ei tohiks soovitatavalt olla suurem kui 3,2; kontsentratsiooni ja mõju vahelise nõrga sõltuvuse puhul võib siiski kasutada suuremat tegurit. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleks seda põhjendada. Uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada vähemalt viit paralleelkultuuri.

26. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses ja/või mürgisuse hindamise lõplikus katses kasutatavate kontsentratsioonide valimisel tuleks arvesse võtta järgmist.

EC_x määramisel peaks EC_x väärtus jääma kasutatavasse kontsentratsioonivahemikku, et tagada tulemuste piisav usaldusväärsus. Näiteks peaks EC_{50} määramisel suurim katsekontsentratsioon olema suurem kui EC_{50} väärtus. Kui EC_{50} väärtus jääb kasutatavast kontsentratsioonivahemikust väljapoole, on asjaomane usaldusvahemik lai ja lähendatud mudeli sobivust katseandmetega ei pruugi olla võimalik statistiliselt hinnata.

Kui eesmärk on leida vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon või täheldatava toime puudumise kontsentratsioon, peaks väikseim katsekontsentratsioon olema piisavalt väike, et kasv ei oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Peale selle peaks suurim katsekontsentratsioon olema piisavalt suur, et kasv oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Vastasel juhul tuleb katset korrata ning kasutada seejuures teistsugust kontsentratsioonivahemikku (kui suurim kasutatav kontsentratsioon ei ole juba võrdne lahustuvuse piirkontsentratsiooniga või suurima nõutava kontsentratsiooniga, näiteks 100 mg/l).

27. Iga katse peaks hõlmama kontrolle, mille puhul kasutatakse sama söödet ja katseorganismi (eelkultuurist valitakse võimalikult homogeenne taimne materjal: noored külgharud, mis lühendatakse otsast mõõtes 2,5 sentimeetrini) ning samu keskkonnatingimusi ja meetodeid kui katsenõude puhul, kuid uuritav kemikaal jäetakse lisamata. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamise korral tuleks lisaks valmistada kontrollkultuur, milles lahusti või dispergeeriva aine kontsentratsioon on sama kui uuritavat kemikaali sisaldavates nõudes. Paralleelseid kontrollnõusid (ja vajaduse korral lahustiga nõusid) peaks olema vähemalt kümme.

28. Kui ei ole vaja määrata täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni, võib katseplaani muuta nii, et suurendatakse uuritava kemikaali kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelide arvu iga kontsentratsiooni kohta. Paralleelseid kontrollkultuure peab siiski olema vähemalt kümme.

Kokkupuude

29. Eelkultuurist võetud noored külgharud, mis on lõigatud otsast mõõdetuna 2,5 cm pikkuseks, jaotatakse aseptilistes tingimustes juhuslikkuse alusel katsenõudesse; iga katsenõu peaks sisaldama ühte 2,5 cm pikkust külgharu, mille ühes otsas asub tipmine meristeem. Valitud taimne materjal peaks olema kõikides katsenõudes sama kvaliteediga.

30. Katsenõude paigutus inkubaatoris peab olema juhuslik, et vähendada asukohast tingitud valgustiheduse ja temperatuuri erinevuste mõju. Samuti on vaja katsenõusid vaatluste tegemise ajal või suurema sagedusega kas kindla skeemi alusel või juhuslikult ümber paigutada.

31. Kui kemikaali püsivuse määramise eelkatsest nähtub, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni ei ole võimalik katse vältel (14 päeva jooksul) püsivana hoida, st kemikaali mõõdetud sisaldus langeb alla 80 % mõõdetud algsisaldusest, soovitatakse kasutada poolstaatilist katserežiimi. Sel juhul tuleks taimed katse jooksul vähemalt ühel korral (nt seitsmendal katsepäeval) üle viia värskelt valmistatud katse- ja kontroll-lahustesse. Värskesse söötmesse

▼M7

üleviimise sagedus sõltub uuritava kemikaali püsivusest; väga ebapüsiva või lenduva kemikaali puhul võib selle sisalduse peaaegu püsivana hoidmiseks olla vaja tagada sagedasem üleviimine värskesse söötmesse.

32. Käesolevas katsemeetodis ei käsitleta kokkupuudet taimelehtedele pritsimise teel.

Katsetingimused

33. Tuleks kasutada päevavalguse spektriga ja/või külmvalget fluorestsentsvalgust, mille valgustihedus jääb vahemikku umbes 100–150 µE m^{-2} s^{-1} (vastab umbes 6 000–9 000 luksile), mõõdetuna fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus 400–700 nm punktides, mis on valgusallikast sama kaugel kui katsenõude põhi. Tuleks kasutada valgustusrežiimi 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust. Valgustiheduse mõõdetav väärtus sõltub mõõtmismeetodist ja eelkõige anduri tüübist. Ühest suunast saabuvale valgusele reageeriva anduri asemel soovitatakse kasutada kerakujulist andurit, mis reageerib nii ülalt- kui ka altpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele, või koosinusandurit, mis reageerib ülaltpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele; sellise anduriga saadakse käesolevas meetodis kirjeldatud mitmepunktilise valgusallika puhul suuremad väärtused.

34. Temperatuur katsenõudes peaks olema 23 ± 2 °C. Erijuhul, nt ebapüsiva kemikaali või metalli mõju uurimisel tuleb pöörata erilist tähelepanu pH muutumisele; pH peaks püsima vahemikus 6–9. Täiendavad juhised on esitatud viites 5.

Kestus

35. Katse lõpetatakse, kui taimede viimisest katsenõudesse on möödunud 14 päeva.

Mõõtmised ja analüüsid

36. Katse alguses on katseorganismi peavõrse pikkus 2,5 cm (vt punkt 29); selle mõõtmiseks kasutatakse joonlauda (vt 4. liide) või fotot ja pildianalüüsi. Tavapärase või ebanormaalse välimusega katseorganismi peavõrse pikkus tuleb mõõta katse alguses, vähemalt üks kord 14 päeva pikkuse kokkupuuteperioodi jooksul ning katse lõpus. Märkus: pildianalüüsi võimaluse puudumise korral võib teise võimalusena kasutada peavõrse pikkuse mõõtmiseks katse alguses ja katse kestel ka steriilset joonlauda, kui töölaud on enne katsenõudesse taimede lisamist steriliseeritud. Tuleks registreerida muutused taimede arengus, näiteks võrsete moondumine, muutused välimuses, nekroosi või kloroosi ilmingud, taimede lagunemine või ujuvuse vähenemine ning muutused juurte pikkuses ja välimuses. Samuti tuleks registreerida olulised muutused katsesöötmes (nt lahustumatu aine esinemine, vetikate, seente ja bakterite kasv katsenõus).

37. Lisaks peavõrse pikkuse määramisele katse jooksul tuleks hinnata uuritava kemikaali mõju ka vähemalt kolmele järgmistest mõõdetavatest muutujatest:

i. külgharude summaarne pikkus,

ii. võrsete summaarne pikkus,

iii. juurte summaarne pikkus,

iv. märgmass,

v. kuivmass,

vi. männaste arv.

▼M7

Märkus 1: kontsentratsioonivahemiku leidmise katses tehtud vaatlused võivad hõlbustada asjakohaste lisanäitajate valimist eespool loetletud kuue muutuja hulgast.

Märkus 2: märg- ja kuivmassi (parameetrid iv ja v) määramine on tungivalt soovitatav.

Märkus 3 Kuna sahharoos ja valgus (juurte sattumine valguse kätte katse vältel) võivad mõjutada auksiini (taimede kasvuhormoon) transporti vahendavaid kandevalke ja kuna mõne kemikaali toimemehhanism võib sarnaneda auksiini omale, on juurte pikkuse (parameeter iii) kasutamine lõppnäitajana küsitav.

Märkus 4: Võrdlusuuringu tulemustest nähtub, et külgharude summaarse pikkuse (parameeter i) variatsioonikordaja on suur (> 60 %). Võrsete summaarne pikkus (parameeter ii) hõlmab niikuinii ka külgharude summaarset pikkust ja selle näitaja variatsioonikordaja on vastuvõetavama väärtusega: < 30 %.

Märkus 5: Eespool esitatud kaalutlustest lähtuvalt soovitatakse kasutada järgmisi mõõdetavaid lõppnäitajaid: võrsete summaarne pikkus, märgmass ja kuivmass (parameetrid ii, iv ja v); parameetri vi – männaste arvu – kasutamine jäetakse katse läbiviija otsustada.

38. Peavõrse pikkuse ja männaste arvu kindlakstegemise eelis seisneb selles, et seda saab katse alguses, kestel ja lõpus iga katse- ja kontrollnõu puhul teha pildistamise ja pildianalüüsi teel, ehkki võib kasutada ka (steriilset) joonlauda.

39. Külgharude summaarset pikkust, juurte summaarset pikkust (kõikide külgharude või juurte pikkus kokku) ja võrsete summaarset pikkust (peavõrse pikkus ja külgharude summaarne pikkus kokku) saab mõõta joonlauaga kokkupuute lõpus.

40. Märg- ja/või kuivmass tuleks määrata katse alguses eelkultuuri representatiivse proovi alusel ning katse lõpus igast katse- ja kontrollnõust saadud taimse materjali alusel.

41. Külgharude summaarse pikkuse, võrsete summaarse pikkuse, juurte summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi ja männaste arvu saab kindlaks teha järgmiselt.

i. Külgharude summaarne pikkus – külgharude pikkuse kindlakstegemiseks saab kokkupuute lõpus mõõta joonlauaga ära kõik külgharud. Külgharude summaarne pikkus on igas katse- ja kontrollnõus mõõdetud kõikide külgharude pikkus kokku.

ii. Võrsete summaarne pikkus – peavõrse pikkuse võib kindlaks teha pildianalüüsi abil või joonlauaga. Võrsete summaarne pikkus on kokkupuute lõpus igas katse- ja kontrollnõus mõõdetud külgharude summaarne pikkus ja peavõrse pikkus kokku.

iii. Juurte summaarne pikkus – juurte pikkuse kindlakstegemiseks saab kokkupuute lõpus mõõta joonlauaga ära kõik juured. Juurte summaarne pikkus on igas katse- ja kontrollnõus mõõdetud kõikide juurte pikkus kokku.

iv. Märgmass – märgmassi määramiseks saab katseorganismid kokkupuute lõpus ära kaaluda. Igast katse- ja kontrollnõust pärit kogu taimne materjal

▼M7

loputatakse destilleeritud veega läbi ja kuivatatakse kergelt tselluloospaberiga. Pärast sellist ettevalmistust määratakse kaalumise teel märgmass. Biomassi (märgmassi) algväärtus määratakse katseorganismide proovi alusel, mis võetakse katsenõude inokuleerimiseks kasutatavast partiist.

v. Kuivmass – pärast märgmassi määramiseks tehtud ettevalmistusi kuivatatakse katseorganisme 60 °C juures, kuni nende mass enam ei muutu. See mass on taimede kuivmass. Biomassi (kuivmassi) algväärtus määratakse katseorganismide proovi alusel, mis võetakse katsenõude inokuleerimiseks kasutatavast partiist.

vi. Männaste arv – loetakse ära kõik peavõrsel paiknevad männased.

Mõõtmiste ja analüüside sagedus

42. Staatilise katserežiimi puhul tuleks mõõta pH igas katsenõus katse alguses ja lõpus. Poolstaatilise katserežiimi puhul tuleks mõõta värske katselahuse pH enne iga lahusevahetust ja määrata ka iga äratarvitatud lahuse pH.

43. Valgustihedust tuleks mõõta kasvukambri, inkubaatori või ruumi punktides, mis on valgusallikast samal kaugusel kui katseorganismid. Valgustihedust tuleks katse jooksul mõõta vähemalt üks kord. Söötme temperatuur kasvukambris, inkubaatoris või ruumis samades tingimustes hoitavas jäljendusnõus tuleks registreerida vähemalt üks kord päevas (või teha seda andmeregistraatori abil pidevalt).

44. Uuritava kemikaali sisaldus määratakse katse ajal sobivate ajavahemike järel. Staatilise katse puhul tuleb uuritava kemikaali sisaldus määrata vähemalt katse alguses ja lõpus.

45. Poolstaatilise katse puhul, kus uuritava kemikaali sisaldus ei püsi eeldatavalt ± 20 % piires nominaalväärtusest, tuleb selle sisaldus määrata kõigis värskelt valmistatud katselahustes ja samades lahustes nende väljavahetamise ajal. Kui uuritava kemikaali mõõdetud algsisaldus erineb nominaalväärtusest enam kui 20 % võrra, kuid on olemas piisavad tõendid selle kohta, et algsisaldus on korratav ja püsiv (st jääb vahemikku 80–120 % algsisaldusest), võib kemikaali sisalduse määrata ainult suurimal ja väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil. Kõigil juhtudel on kemikaali sisaldus igal katses kasutataval kontsentratsioonil vaja enne katselahuse väljavahetamist määrata ainult ühes paralleelnõus (või paralleelnõude sisu koondproovis).

46. Kui on tõendatud, et uuritava kemikaali sisaldus ei kõigu katse vältel nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtusega võrreldes rohkem kui ± 20 %, võib tulemuste analüüsimisel võtta aluseks nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtuse. Kui kõrvalekalle sisalduse nominaalväärtusest või mõõdetud algväärtusest on suurem kui ± 20 %, tuleks tulemuste analüüsimisel võtta aluseks katse vältel esinenud väärtuste geomeetriline keskmine või mõni uuritava kemikaali sisalduse vähenemist kirjeldav mudel (5).

Piirsisalduskatse

47. Teatavatel juhtudel, näiteks kui eelkatsest selgub, et uuritav kemikaal ei avalda kontsentratsioonil kuni 100 mg/l või katsesöötmes lahustuvuse piirkontsentratsioonil või valmistise puhul dispergeeruvuse piirkontsentratsioonil mürgist mõju, võib teha piirsisalduskatse, milles võrreldakse kasvu kontrollrühmas ja ühes katserühmas, kus kemikaal esineb kontsentratsioonis 100 mg/l või lahustuvuse piirkontsentratsioonis. Piirsisalduskatse tegemisel soovitatakse tungivalt määrata ka kokkupuutekontsentratsioon. Piirsisalduskatse puhul kohaldatakse kõiki eespool kirjeldatud katsetingimusi ja nõuetele

▼M7

vastavuse kriteeriume; ainsa erandina nähakse ette, et uuritava kemikaaliga paralleelkultuure peaks olema kaks korda rohkem. Kasvu analüüsimiseks kontrollrühmas ja katserühmades võib keskväärtusi võrrelda statistilise testi (nt Studenti t-testi) abil.

ANDMED JA ARUANDLUS

Uuritavad muutujad

48. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju *Myriophyllum spicatum*'i vegetatiivsele kasvule. Käesolevas katsemeetodis on kirjeldatud kahte uuritavat muutujat.

a) Keskmine kasvu erikiirus: see uuritav muutuja arvutatakse lähtuvalt peavõrse pikkuse logaritmi ja teiste mõõdetavate muutujate, st võrsete summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi ja männaste arvu logaritmitud väärtuse ööpäevasest muutusest kontrollkultuurides ja igas uuritava kemikaaliga rühmas. *Märkus*: mõõdetavad parameetrid külgharude summaarne pikkus ja juurte summaarne pikkus ei võimalda arvutada keskmist kasvu erikiirust. Katse alguses ei ole katseorganismil külgharusid ega juuri (tulenevalt eelkultuuri taimede ettevalmistamise viisist); kasvu keskmise erikiiruse arvutamisel ei saa lähtuda algväärtusest null.

b) Saagis: see uuritav muutuja arvutatakse lähtuvalt katse lõpuks toimunud peavõrse pikkuse ja teiste mõõdetavate muutujate – st soovitatavalt võrsete summaarse pikkuse, märgmassi ja kuivmassi või männaste arvu ning soovi korral ka muude parameetrite – väärtuse muutusest kontrollkultuurides ja igas uuritava kemikaaliga rühmas.

49. Mürgisuse hindamisel tuleks lähtuda peavõrse pikkusest ja veel kolmest mõõdetavast muutujast (st soovitatavalt võrsete summaarsest pikkusest, märgmassist ja kuivmassist või männaste arvust; vt punkt 37 ning selle punkti märkused 2, 4 ja 5), sest mõni kemikaal võib mõjutada muid mõõdetavaid muutujaid palju enam kui peavõrse pikkust. Ainult peavõrse pikkuse vaatlemisel jääks selline mõju avastamata.

Keskmine kasvu erikiirus

50. Iga kontrollkultuuri ja uuritava kemikaaliga kultuuri puhul arvutatakse teatava ajavahemiku keskmine kasvu erikiirus kasvu iseloomustavate muutujate – peavõrse pikkuse ja veel kolme mõõdetava muutuja (st võrsete summaarse pikkuse, märgmassi ja kuivmassi või männaste arvu) – logaritmitud väärtuse suurenemise alusel järgmise valemi abil:

$$\mu_{i-j} = \frac{\left(\ln\left(N_j\right) - \ln\left(N_i\right)\right)}{t}$$

kus

μ_{i-j} on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul i–j,

N_i on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel i,

N_j on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel j ja

t on ajavahemik i–j.

▼M7

Kontrollrühma ja iga katserühma puhul arvutatakse kasvukiiruse keskmine väärtus ja tulemuste hajuvus.

51. Keskmine kasvu erikiirus tuleks arvutada kogu katseperioodi kohta (eespool esitatud valemis vastab katse algusele ajahetk i ja katse lõpule ajahetk j). Kontrollrühma ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse kasvu keskmise erikiiruse keskväärtus ja tulemuste hajuvus. Peale selle hinnatakse kasvukiirust ka ajavahemike kaupa, näiteks logaritmitud kasvukõverate uurimise teel, et hinnata uuritava kemikaali mõju kokkupuuteaja jooksul.

52. Seejärel võib iga katses kasutatava kontsentratsiooni (katserühma) puhul arvutada kasvukiiruse vähenemise I_r protsentides järgmise valemi abil:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kus

% I_r on kasvu keskmise erikiiruse vähenemise määr protsentides,

μ_C on μ keskväärtus kontrollrühmas ja

μ_T on μ keskväärtus katserühmas.

Saagis

53. Kemikaali mõju saagisele määratakse lähtuvalt peavõrse pikkusest ja veel kolmest mõõdetavast muutujast (st soovitatavalt võrsete summaarsest pikkusest, märgmassist ja kuivmassist või männaste arvust), mis määratakse igas katsekultuuris katse alguses ja lõpus. Märgmassi ja kuivmassi algväärtus määratakse katseorganismide proovi alusel, mis võetakse katsenõude inokuleerimiseks kasutatavast partiist. Kontrollrühmas ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse keskmine saagis ning tulemuste hajuvus. Saagise vähenemise määra protsentides (% I_y) võib iga katserühma puhul arvutada järgmiselt:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

kus

% I_y on saagise vähenemise määr protsentides,

b_C on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe kontrollrühmas ja

b_T on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe katserühmas.

Peavõrse pikkuse kahekordistumise aeg

54. Peavõrse pikkuse kahekordistumise aja T_d leidmiseks ja katse sellekohase nõuetele vastavuse kriteeriumi täitmise kindlakstegemiseks (vt punkt 8) kasutatakse kontrollkultuuridest saadud andmeid ja järgmist valemit:

$T_d = \ln 2 / \mu$,

kus μ on punktides 50–52 kirjeldatud viisil määratud keskmine kasvu erikiirus.

▼M7

Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverate koostamine

55. Tuleks koostada kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverad, mis väljendavad uuritava muutuja väärtuse vähenemise keskmise protsentuaalse määra (punkti 53 kohaselt arvutatud % I_r või % I_y) sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsiooni logaritmitud väärtusest.

EC_x leidmine

56. EC_x hinnanguliste väärtuste leidmisel tuleks lähtuda nii keskmisest kasvu erikiirusest (E_rC_x) kui ka saagisest (E_yC_x), mis peaksid kumbki omakorda põhinema peavõrse pikkusel ja võimaluse korral täiendavatel mõõdetavatel muutujatel (st soovitatavalt võrsete summaarsel pikkusel, märgmassil ja kuivmassil või männaste arvul). Selle põhjuseks on asjaolu, et teatavad kemikaalid mõjutavad peavõrse pikkust ja muid mõõdetavaid muutujaid erinevalt. Määratavad mürgisuse näitajad igal arvutataval kasvu pidurdumise tasemel x on seega neli EC_x väärtust: E_rC_x (peavõrse pikkus), E_rC_x (soovitatavalt võrsete summaarne pikkus, märgmass, kuivmass või männaste arv), E_yC_x (peavõrse pikkus), E_yC_x (soovitatavalt võrsete summaarne pikkus, märgmass, kuivmass või männaste arv).

57. Tuleks silmas pidada, et nende kahe uuritava muutuja puhul arvutatud EC_x väärtused ei ole võrreldavad, ning seda erinevust võetakse katsetulemuste kasutamisel arvesse. Käesolevas katsemeetodis sätestatud tingimuste kohase katse puhul on keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad EC_x väärtused (E_rC_x) enamikul juhtudel suuremad kui saagisel põhinevad väärtused (E_yC_x), kuna asjaomaste lähenemisviiside matemaatiline alus on erinev. Seda erinevust ei tohiks tõlgendada kahe kõnealuse uuritava muutuja tundlikkuse erinevusena; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad.

Statistilised meetodid

58. Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. On võimalik kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast mõjuandmete lineariseerivat teisendamist näiteks vastavalt probit-, logit- või Weibulli mudelile (7), kuid tuleks siiski eelistada mittelineaarse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kasvu täielikule pidurdumisele või pidurdumise täielikule puudumisele lähedases olukorras võib kõnealune teisendamine andmevigu võimendada ja analüüsi segada (7). Tuleks silmas pidada, et probit-, logit- või Weibulli teisendusel põhinevad standardsed analüüsimeetodid on ette nähtud binaarsete tunnuste (nt suremus või elulemus) analüüsimiseks ning neid tuleks kasvukiiruse või saagise andmete analüüsimiseks kohandada. Konkreetsed meetodid EC_x väärtuste leidmiseks pidevate andmete alusel on esitatud viidetes 8–10.

59. Iga uuritava muutuja puhul arvutatakse kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera põhjal EC_x hinnanguline väärtus. Võimaluse korral tuleks määrata iga hinnangulise väärtuse usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Mõjuandmete sobivust regressioonimudeliga tuleks hinnata graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsi tegemisel tuleks kasutada mitte katserühmade andmete keskväärtusi, vaid igas üksikus paralleelkultuuris saadud väärtusi.

60. Kui olemasolevad regressioonimudelid ja -meetodid ei ole katseandmete jaoks sobivad, võib EC_{50} hinnangulise väärtuse ja usalduspiiride leidmiseks kasutada ka lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (10).

61. Et teha kindlaks vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ja selle alusel ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon, on vaja võrrelda katserühmade keskväärtusi dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetoditega. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskväärtust võrreldakse seejärel sobiva mitmese võrdluse või trenditesti meetodi abil kontrollrühma keskväärtusega. Selleks võib sobida Dunnetti või Williamsi test (12–16). Tuleb hinnata, kas kehtib dispersioonanalüüsi eeldus, et hajuvus on homogeenne. Seda võib teha graafiku alusel või formaalse testi (15), näiteks Levene'i või

▼M7

Bartletti testi abil. Kui hajuvuse homogeensuse eeldus ei kehti, võib mõnikord homogeensuse saavutada andmete logaritmilise teisendamisega. Kui hajuvuse heterogeensus on väga suur ja seda ei saa teisendamisega korrigeerida, tuleks kaaluda mõne muu meetodi, näiteks muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i trenditesti kasutamist. Lisajuhised täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks on esitatud viites 10.

62. Uute teadussaavutuste põhjal on soovitatud loobuda täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni mõistest ja asendada see regressiooni teel leitud hinnangulise näitajaga EC_x. Käesoleva *Myriophyllum*'it käsitleva katsemeetodi jaoks ei ole sobivat x väärtust veel kindlaks määratud. Sobiv väärtuste vahemik näib olevat 10–20 % (olenevalt uuritavast muutujast) ning soovitatavalt tuleks esitada nii EC_{10} kui ka EC_{20} koos vastavate usalduspiiridega.

Katseprotokoll

63. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus, nt koostisosade keemiline määratlus (vt eespool), kvantitatiivne sisaldus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused.

Katseliik:

— teaduslik nimetus ja päritolu.

Katsetingimused:

— kasutatud katsemeetod (staatiline või poolstaatiline meetod);

— katse alustamise kuupäev ja katse kestus;

— katsesööde;

— katseplaani kirjeldus: katsenõud ja nende katted, lahuste ruumala, peavõrse pikkus katsenõudes katse alguses;

— kasutatud kontsentratsioonid (nominaalne ja vajaduse korral mõõdetud sisaldus) ja paralleelkultuuride arv kontsentratsiooni kohta;

— põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, sh lahustite või dispergeerivate ainete kasutamise kirjeldus;

— katsetemperatuur;

— valgusallikas, valgustihedus ja valguse ühtlus;

— katse- ja kontrollsöötmete pH väärtused;

— uuritava kemikaali määramise meetod ja asjakohased kvaliteedihindamise andmed (valideerimisuuringud, analüüsiandmete standardhälbed või usalduspiirid);

▼M7

— peavõrse pikkuse ja muude mõõdetavate muutujate, näiteks külgharude summaarse pikkuse, võrsete summaarse pikkuse, juurte summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi või männaste arvu määramise meetodid;

— kultuuri staatus (steriilne või mittesteriilne) igas katse- ja kontrollnõus iga vaatluse ajal;

— kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist.

Tulemused:

— töötlemata andmed: peavõrse pikkus ja muude mõõdetavate muutujate väärtus igas uuritava kemikaaliga kultuuris ja kontrollkultuuris iga vaatluse ja analüüsi ajal;

— iga mõõdetava muutuja keskväärtused ja standardhälbed;

— igale mõõdetavale muutujale vastavad kasvukõverad;

— uuritavate muutujate arvutatud väärtused igas uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris ning paralleelkultuuride andmete keskväärtused ja variatsioonikordajad;

— kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;

— uuritavate muutujate puhul määratud mürgisuse lõppnäitajad – nt EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} – ja vastavad usaldusvahemikud; asjaomaste andmete olemasolu korral vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ja/või täheldatava toime puudumise kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;

— dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamise korral mõju määr, mida on võimalik tuvastada (nt väikseim oluline erinevus);

— katserühma mis tahes kultuuris täheldatud stimuleeriv mõju kasvule;

— kõik nähtavad fütotoksilisuse ilmingud ja tähelepanekud katselahuste kohta;

— tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

(1) ASTM. Standard E 1913-04. Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(2) Maletzki, D., *et al*. (2010). *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol. *Umweltwiss. Schadst. Forsch.* 22: 702–710.

(3) Käesoleva lisa peatükk C.26 „Perekonna *Lemna* taimede kasvu pidurdumise katse“.

(4) OECD (2014). *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 205. OECD Publishing, Pariis.

(5) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 23. OECD Publishing, Pariis.

(6) Käesoleva lisa peatükk C.51 „Mürgisuse hindamise katse *Myriophyllum spicatum*'iga süsteemis vesi/sete“.

▼**M7**

(7) Christensen, E. R., ja Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Environ. Sci. Technol.* 18 (9): 713–718.

(8) Nyholm, N., *et al*. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11 (2): 157–167.

(9) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (10): 1485–1494.

(10) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 54. OECD Publishing, Pariis.

(11) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN.

(12) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50 (272): 1096–1121.

(13) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20 (3): 482–491.

(14) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27 (1): 103–117.

(15) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28 (2): 519–531.

(16) Brain, P., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res.* 29 (2): 93–96.

▼M7

1. liide

MÕISTED

Biomass – populatsiooni elusaine märgmass ja/või kuivmass. Käesoleva katsemeetodi puhul on biomass peavõrse, kõikide külgharude ja kõikide juurte summaarne mass.

Kemikaal – aine või segu.

Kloroos – katseorganismi, eriti männaste rohelise värvuse muutumine kollakaks.

EC_x – katsesöötmes lahustatud uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul *Myriophyllum spicatum*'i kasv pidurdub kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul x % (nt 50 %) võrra (kui kokkupuuteaeg erineb katse tavapärasest või täiskestusest, tuleb täpselt märkida selle kestus). Kasvukiiruse või saagise alusel arvutatava EC väärtuse üheselt arusaadavaks tähistamiseks kasutatakse kasvukiiruse puhul tähist „E_rC“ ja saagise puhul tähist „E_yC“, mille järel märgitakse kasutatud mõõdetav muutuja, nt „E_rC (peavõrse pikkus)“.

Kasv – mõõdetava muutuja (nt peavõrse pikkuse, külgharude summaarse pikkuse, võrsete summaarse pikkuse, juurte summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi või männaste arvu) väärtuse suurenemine katse vältel.

Kasvukiirus (keskmine kasvu erikiirus) – mõõdetava muutuja väärtuse logaritmiline suurenemine kokkupuuteperioodi jooksul. *Märkus*: kasvukiirusega seotud uuritavad muutujad ei sõltu katse kestusest, kuni kemikaaliga mitte kokku puutuvate kontrollorganismide kasv on eksponentsiaalne.

Vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon – väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ($p < 0,05$) kasvu pidurdavat mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peaks kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon) on valitud.

Mõõdetav muutuja – mis tahes liiki muutuja, mida mõõdetakse katse lõppnäitaja väljendamiseks ühe või mitme eri uuritava muutuja kaudu. Käesoleva katsemeetodi puhul on mõõdetavad muutujad peavõrse pikkus, külgharude summaarne pikkus, võrsete summaarne pikkus, juurte summaarne pikkus, märgmass, kuivmass ja männaste arv.

Monokultuur – ühe liigi taimede kultuur.

Nekroos – protsess, mille tagajärjel tekib katseorganismi surnud (st valge või tumepruun) kude.

Täheldatava toime puudumise kontsentratsioon – kontsentratsioon, mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni.

Uuritav muutuja – mürgisuse hindamiseks kasutatav muutuja, mis on leitud biomassi kirjeldava mõõdetud muutuja alusel vastavalt asjakohasele arvutusmeetodile. Käesoleva katsemeetodi puhul on uuritavad muutujad kasvukiirus ja saagis, mis on leitud selliste mõõdetavate muutujate alusel nagu peavõrse pikkus, võrsete summaarne pikkus, märgmass, kuivmass või männaste arv.

Poolstaatiline (lahusevahetusega) katse – katse, mille käigus katselahus teatavate ajavahemike järel perioodiliselt välja vahetatakse.

▼M7

Staatiline katse – katse, mille käigus katselahust ei uuendata.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Katse lõppnäitaja – katse eesmärgile vastav üldine näitaja, mis muutub uuritava kemikaali mõjul kontrollrühma asjaomase näitajaga võrreldes. Käesoleva katsemeetodi puhul on katse lõppnäitaja kasvu pidurdumine, mida võib väljendada ühel või mitmel mõõdetaval muutujal põhinevate uuritavate muutujate abil.

Katsesööde – täielik sünteetiline kasvukeskkond, milles katsetaimi kasvatatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav kemikaal katsesöötmes.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Saagis – kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetava muutuja väärtuste vahe, mille kaudu väljendatakse biomassi suurenemist katse vältel. *Märkus*: kui kemikaaliga mitte kokku puutuvate organismide kasv on eksponentsiaalne, muutub saagisel põhinevate uuritavate muutujate väärtus katse vältel väiksemaks.

▼M7

2. liide

MUUDETUD ANDREWSI SÖÖDE TÜVIKULTUURI JA EELKULTUURI JAOKS

Tüvikultuuri ja eelkultuuri jaoks vajalik muudetud Andrewsi sööde valmistatakse viiest eraldi valmistatud toitainete põhilahusest, millele lisatakse 3 % sahharoosi.

Tabel 1

Andrewsi söötme koostis (ASTMi standard E 1913-04)

Toitainete põhilahuste valmistamine			Söötme valmistamine
Põhilahus	Kemikaal	Algkogus 1 000 ml kohta	Milliliitrit 5 l söötme kohta
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7H_2O$	9,86 g	50
3	Vt põhilahus 3.1 allpool		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2H_2O$	0,372 g	

Põhilahuseid võib hoida külmikus (5–10 °C juures) 6 kuud. Üksnes põhilahuse nr 5 säilivusaeg on lühem (kaks kuud).

Tabel 2

Põhilahuse nr 3.1 valmistamine põhilahuse nr 3 jaoks

Kemikaal	Algkogus grammides 100 ml kohta
$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$	0,0037

Pärast põhilahuse nr 3.1 valmistamist (tabel 2) sügavkülmutatakse see umbes 11 ml suuruste alikvootidena (vähemalt –18 °C juures). Sügavkülmutatuna säilib lahus viis aastat.

Põhilahuse nr 3 valmistamiseks sulatatakse põhilahus nr 3.1, viiakse 10 ml sellest 1-liitrisesse mõõtekolbi ja lisatakse ultrapuhast vett kuni kolvi mõõtemärgini.

Muudetud Andrewsi söötme valmistamiseks lisatakse 5-liitrisesse mõõtekolbi umbes 2 500 ml ultrapuhast vett. Pärast 50 ml iga põhilahuse lisamist täidetakse mõõtekolb 90 % ulatuses ultrapuhta veega ja reguleeritakse pH väärtusele 5,8.

▼M7

Seejärel lisatakse 150 g lahustatud sahharoosi (3 protsenti 5 liitris lahuses) ja mõõtekolb täidetakse mõõtemärgini ultrapuhta veega. Lõpuks viiakse sööde 1-liitristesse Schotti kolbidesse ja seda autoklaavitakse 20 minutit 121 °C juures.

Nii saadud söödet saab säilitada külmikus (5–10 °C juures) steriilsena kolm kuud.

Muudetud Andrewsi sööde settevaba mürgisuskatse jaoks

Tabelites 1 ja 2 nimetatud viiest toitainete põhilahusest valmistatakse katselahuste saamiseks vajalik kümnekordselt kontsentreeritud muudetud Andrewsi sööde, mis sisaldab täiendavalt 30 % sahharoosi. Selleks lisatakse 1-liitrisesse mõõtekolbi umbes 100 ml ultrapuhast vett. Pärast 100 ml iga põhilahuse lisamist reguleeritakse pH väärtusele 5,8. Seejärel lisatakse 30 % lahustatud sahharoosi (300 grammi 1 000 ml kohta) ja mõõtekolb täidetakse mõõtemärgini ultrapuhta veega.

Lõpuks viiakse sööde 0,5-liitristesse Schotti kolbidesse ja seda autoklaavitakse 20 minutit 121 °C juures.

Nii saadud kümnekordselt kontsentreeritud muudetud söödet saab säilitada külmikus (5–10 °C juures) steriilsena kolm kuud.

▼M7

3. liide

TÜVIKULTUURI SÄILITAMINE

Käesolevas 3. liites on kirjeldatud perekonda vesikuusk kuuluva kaheidulehelise veesisese liigi *Myriophyllum spicatum* L. ([1]) tüvikultuuri. Ajavahemikul juunist augustini ilmuvad veepinna kohale silmatorkamatud roosakasvalged õied. Taimed on juurdunud tugevate risoomide süsteemi abil ja neid võib leida kogu põhjapoolkeral eutroofsetes, kuid saastumata ja lubjarikkamates mudase põhjaga seisuveekogudes. *Myriophyllum spicatum* eelistab magevett, kuid võib esineda ka riimvees.

Settevaba katse puhul laboritingimustes kasutatava tüvikultuuri jaoks on vaja steriilseid taimi. Steriilsed taimed on kättesaadavad Saksamaa Keskkonnaameti (Umweltbundesamt) ökotoksikoloogialaborist.

Teise võimalusena võib katseorganismid saada mittesteriilsetest taimedest vastavalt ASTMi standardile E 1913-04. Allpool on esitatud väljavõte ASTMi standardjuhendist, milles käsitletakse loodusest kogutud *Myriophyllum sibiricum*'i kultiveerimise meetodit.

„Kui kultiveerimist alustatakse loodusest kogutud mittesteriilsete taimedega, kogutakse sügisel *M. sibiricum*'i sigipungad. Sigipungad viiakse 20-liitrisesse akvaariumi, milles on 5 cm paksune steriilse sette kiht, mis on kaetud räniliivaga või näiteks tootega Turface® ja 18 liitri analüütilise puhtusastmega veega. Akvaariumi aereeritakse ja hoitakse temperatuuril 15 °C ning valguse vootihedust hoitakse 16 tunni vältel päevas väärtusel 200–300 µmol m^{-2} s^{-1}. Taimekultuuri võib akvaariumis säilitada taimede varuallikana, mida saab kasutada juhul, kui steriilsed taimekultuurid hävivad kasvukambri mehaanilise rikke või saastuse tõttu või mõnel muul põhjusel. Akvaariumis kasvatatavad taimed ei ole steriilsed ja steriilseid kultuure ei saa säilitada mittepidevas kultiveerimissüsteemis. Kultuuri steriliseerimiseks eemaldatakse taimed akvaariumist ja loputatakse neid umbes 0,5 tundi voolava deioniseeritud vee all. Taimede desinfitseerimiseks hoitakse neid laminaarkapis aseptilistes tingimustes vähem kui 20 minuti vältel (kuni enamik taimekudedest on pleekinud ja ainult kasvukuhik on veel roheline) lahuses, mis sisaldab 3 % (massiühikutes mahuühiku kohta) naatriumhüpokloritit ja 0,01 % sobivat pindaktiivset ainet. Desinfitseerimisvahendit ja taimset materjali loksutatakse. Mitut varresõlme sisaldavad segmendid viiakse steriilsetesse kultiveerimiseks kasutatavatesse katseklaasidesse, mis sisaldavad 45 ml steriliseeritud muudetud Andrewsi söödet ja on kaetud tavalise katseklaasikorgiga. Igasse katsekambrisse viiakse ainult üks taimesegment. Kultiveerimisnõu korgi kinnitamiseks kasutatakse laboratoorset tihenduskilet. Pärast steriilse kultuuri loomist tuleks mitut varresõlme sisaldavad taimesegmendid viia iga kümne kuni kaheteistkümne päeva järel üle uutesse värsket vedelsöödet sisaldavatesse katsekambritesse. Katse alustamiseks peavad taimed püsima katsele eelneva kaheksa nädala vältel steriilsed; seda tõendatakse agariga tassidel kultiveerimise teel.“

Kuna muudetud Andrewsi sööde sisaldab sahharoosi (mis soodustab seente ja bakterite kasvu), tuleb kõiki materjale ja lahuseid hoida steriilsena ning viia kultiveerimine läbi steriilsetes tingimustes. Enne kasutamist steriliseeritakse kõik vedelikud ja seadmed. Selleks töödeldakse neid 4 tunni vältel kuuma õhuga (210 °C) või autoklaavitakse 20 minutit 121 °C juures. Peale selle töödeldakse kõiki kolbe, nõusid, kausse jms ning muid seadmeid vahetult enne kasutamist steriilsel töölaual leegiga.

Tüvikultuure võib säilitada pikemat aega vähendatud valgustiheduse ja madalama temperatuuri juures (50 µE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C), ilma et neid oleks vaja uuendada.

([1]) Carl von Linné (sünd. 23. mail 1707 Råshultis/Älmhultis, surn. 10. jaanuaril 1778 Uppsalas).

▼M7

Myriophyllum'i tüvikultuuride sööde peaks olema sama, mida kasutatakse katsetes; võib siiski kasutada ka muid toitainerikkaid söötmeid.

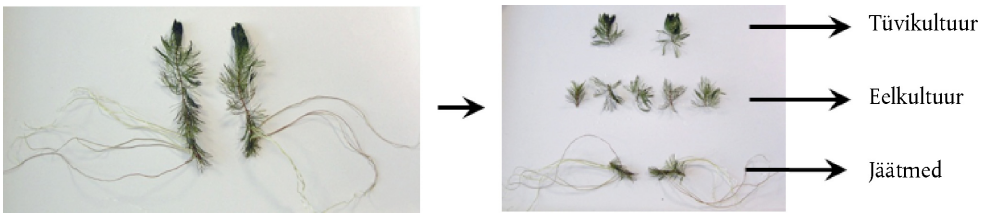
Taimesegmendid jaotatakse puhaskultuurina mitmesse 500 ml Erlenmeyeri kolbi ja/või 2 000 ml Fernbachi kolbi, milles on vastavalt umbes 450 või 1 000 ml muudetud Andrewsi söödet. Seejärel suletakse kolvid steriilselt tsellulooskorgiga.

Peale selle on vältimatult vajalik töödelda seadmeid vahetult enne kasutamist steriilsel töölaual põhjalikult leegiga. Taimed tuleb nende arvust ja suurusest olenevalt viia umbes iga kolme nädala järel üle värskesse söötmesse.

Sel viisil kultuuri uuendamiseks võib kasutada nii võrse tippu kui ka varre keskosa segmente. Üle viidavate taimede (või taimesegmentide) arv ja suurus sõltub vajaminevate taimede arvust. Näiteks võib ühte Fernbachi kolbi viia viis võrsesegmenti ja ühte Erlenmeyeri kolbi kolm võrsesegmenti pikkusega 5 cm. Juurtega, õitsevad, surnud või muidu silmatorkavad osad kõrvaldatakse.

Joonis 1

Taimede lõikamine tüvikultuuri ja eelkultuuri jaoks pärast 3 nädala pikkust kultiveerimist



Taimi kultiveeritakse 500 ml Erlenmeyeri kolbides ja 2 000 ml Fernbachi kolbides jahutusega inkubaatoris 20 ± 2 °C juures muutumatul valgustihedusel umbes 100–150 µE m^{-2} s^{-1} (6 000–9 000 luksi); kambri valguse värvustemperatuur peaks vastama soevalge valguse spektrile.

Joonis 2

Taimede kultiveerimine valgustuse ja jahutusega inkubaatoris



Tuleks kasutada keemiliselt puhtaid (happega pestud) steriilseid klaasist kultiveerimisnõusid ja aseptilisi käitlemismeetodeid. Tüvikultuuri saastumisel näiteks vetikate, seente ja/või bakteritega tuleks luua uus kultuur või kasutada kultuuri uuendamiseks mõne muu labori tüvikultuuri.

▼M7

4. liide

EELKULTUURI KASVATAMINE JA KATSEORGANISMIDE ETTEVALMISTAMINE KATSEKS

Eelkultuuri saamiseks lõigatakse tüvikultuuri võrsed kahe männasega segmentideks ning segmendid viiakse Fernbachi kolbidesse, mis on täidetud muudetud Andrewsi söötmega (sisaldab 3 % sahharoosi). Igasse kolbi võib viia kuni 50 võrsesegmenti. Tuleks siiski jälgida, et kõnealused segmendid oleksid elujõulised ja neil ei esineks juuri, külgharusid ega nende pungasid (vt 3. liite joonis 1).

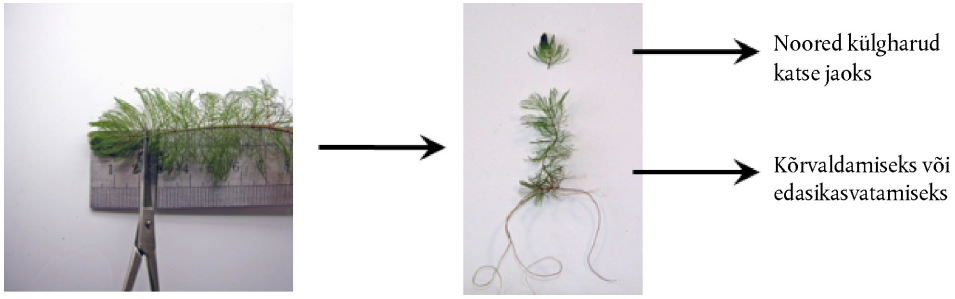
Eelkultuuri organisme kasvatatakse 14–21 päeva kasvukambris steriilsetes tingimustes valgustusrežiimil 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust. Valitud valgustihedus peaks jääma vahemikku 100–150 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$. Temperatuur katsenõudes peaks olema 23 ± 2 °C.

Kuna muudetud Andrewsi sööde sisaldab sahharoosi (mis soodustab vetikate, seente ja bakterite kasvu), tuleks kasutada uuritava kemikaaliga lahuste valmistamisel ja kultiveerimise ajal steriilseid tingimusi. Enne kasutamist steriliseeritakse kõik vedelikud ja seadmed. Selleks töödeldakse neid 4 tunni vältel kuuma õhuga (210 °C) või autoklaavitakse 20 minutit 121 °C juures. Peale selle töödeldakse kõiki kolbe, nõusid, kausse jms ning muid seadmeid vahetult enne kasutamist steriilsel töölaual leegiga.

Võrsed eemaldatakse puhaskultuurina eelkultiveerimiskolbidest; valitav materjal peaks olema võimalikult homogeenne. Iga katse jaoks on vaja vähemalt 60 katseorganismi (kaheksal uuritava kemikaali kontsentratsioonil tehtava katse puhul). Eelkultuurist võetakse katse jaoks noored külgharud, lõigatakse need otsast joonlauaga mõõdetuna 2,5 cm pikkuseks ja viiakse steriilset muudetud Andrewsi söödet sisaldavasse keeduklaasi. Neid noori külgharusid võib kasutada settevabas mürgisuskatses *Myriophyllum spicatum*'iga.

Joonis 2

Eelkultuuri taimede lõikamine *Myriophyllum spicatum*'iga tehtava settevaba mürgisuskatse jaoks



▼M7

C.51. **Mürgisuse hindamise katse *Myriophyllum spicatum*'iga süsteemis vesi/sete**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 239 (2014). On olemas katsemeetodid üheiduleheliste ujutaimede perekonna *Lemna* liikide jaoks (1) ja vetikaliikide jaoks (2). Neid meetodeid kasutatakse igapäevaselt selliste andmete saamiseks, mis võimaldavad hinnata uuritavatest kemikaalidest, eriti herbitsiidse toimega kemikaalidest tulenevat riski muudele veetaimedele kui sihtliigid. Mõnel juhul võib siiski olla vaja andmeid teistegi makrofüüdiliikide kohta. Keskkonnatoksikoloogia ja -keemia Ühingu (SETAC) seminari põhjal, kus käsitleti pestitsiididest tuleneva makrofüütidele avalduva riski hindamist, avaldati hiljuti suunised, mille kohaselt võib olla vaja esitada mõnda juurdunud makrofüüdiliiki käsitlevad andmed selliste kemikaalide kohta, mille toimemehhanismi suhtes *Lemna* ja vetikad ei ole teadaolevalt tundlikud või mille puhul teeb muret kemikaali kogunemine settesse ja sellest tulenev kokkupuude juurte kaudu omastamisel (3). Praeguste teadmiste ja kogemuste põhjal valiti eelistatud liikideks *Myriophyllum*'i liigid, mida tuleks kasutada juhul, kui on vaja andmeid juurdunud veesisese kaheidulehelise liigi kohta (4–6). Käesolev katsemeetod ei asenda muid veekeskkonnas avalduva mürgisuse hindamise meetodeid, vaid pigem täiendab neid ja võimaldab täielikumalt hinnata ohte ja riske veetaimedele. Käesolev süsteemis vesi/sete kasutatav *Myriophyllum spicatum*'il põhinev katsemeetod täiendab settevabas süsteemis *Myriophyllum spicatum*'ile avalduva mürgisuse hindamise meetodit (7).

2. Käesolevas dokumendis on kirjeldatud katsemeetodit, mis võimaldab hinnata uuritava kemikaali mõju juurdunud veetaimele *Myriophyllum spicatum*, mis kasvab süsteemis vesi/sete. Meetod põhineb osaliselt olemasolevatel meetoditel (1, 2, 8) ja selles võetakse arvesse veetaimedele avalduva riski hindamisega seotud hiljutisi teadusuuringuid (3). Süsteemile vesi/sete tuginev meetod on valideeritud rahvusvahelise võrdlusuuringuga, kus staatilistes tingimustes kasvatatud *Myriophyllum*'i liigid viidi uuritava kemikaaliga kokkupuutesse kemikaali veesambasse lisamise teel (9). Seda katsesüsteemi saab aga hõlpsalt kohandada rikastatud sette kaudu kokkupuute jaoks, samuti veefaasi kaudu kokkupuute jaoks poolstaatilises või impulssdoseerimise režiimis, ehkki nende režiimide puhul ei ole tehtud ametlikku võrdlusuuringut. Peale selle võib kõnealust üldmeetodit kasutada muude juurdunud veesiseste ja üle veepinna ulatuvate liikide, sealhulgas teiste *Myriophyllum*'i liikide (nt *Myriophyllum aquaticum*'i) ja *Glyceria maxima* puhul (10). Muude liikide kasutamise korral võib olla vaja muuta katsetingimusi, katseplaani ja katse kestust. Eelkõige on vaja teha tööd asjakohase metoodika määratlemiseks *Myriophyllum aquaticum*'i jaoks. Käesolevas katsemeetodis ei käsitleta üksikasjalikult neid lisavõimalusi, vaid kirjeldatakse standardset lähenemisviisi, mis põhineb *Myriophyllum spicatum*'i kokkupuutel staatilises süsteemis veefaasi kaudu.

3. Käesolevat katsemeetodit kohaldatakse ainete puhul, mille jaoks see on valideeritud (üksikasjalik teave on esitatud võrdlusuuringu aruandes (9)), ning valmististe ja teadaolevate segude puhul. *Myriophyllum*'iga katse võib teha esimese taseme andmenõuete täitmiseks tulenevalt võimalikest probleemidest seoses uuritava kemikaali kogunemisega settesse või selle toimemehhanismiga/selektiivsusega. Samuti võib laborikatse *Myriophyllum*'iga olla nõutav osana kõrgema taseme strateegiast, milles käsitletakse veetaimedele avalduva riskiga seotud küsimusi. Kokkupuuteviis (st vee kaudu või sette kaudu) valitakse lähtuvalt katse tegemise konkreetsest eesmärgist. Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks regulatiivsel eesmärgil tuleks kaaluda, kas ja kuidas see meetod võimaldab saada taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused. Seda ei ole vaja kaaluda, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

▼M7

KATSE PÕHIMÕTE

4. Katses hinnatakse kemikaaliga seotud mõju standardses keskkonnas (vesi, sete ja toitained) kasvavate *Myriophyllum*'i isendite vegetatiivsele kasvule. Selleks istutatakse tervete mitteõitsevate taimede võrsetipud standarditud kunstlikku settesse, millele on taimede piisava kasvu tagamiseks lisatud täiendavad toitained, ja kasvatatakse neid Smarti ja Barko söötmes (1. liide). Pärast juurte tekkeks vajalikku kohanemisperioodi viiakse taimed kokkupuutesse veesambasse eri kontsentratsioonides lisatud uuritava kemikaaliga. Teise võimalusena võib settekaudse kokkupuute jäljendamiseks rikastada uuritava kemikaaliga kunstlikku setet ja istutada taimed ümber rikastatud settesse. Kummalgi juhul kasvatatakse taimi seejärel kontrollitud keskkonnatingimustes 14 päeva. Kasvule avalduva mõju kindlakstegemiseks hinnatakse kvantitatiivselt võrsete pikkust, märgmassi ja kuivmassi ning tehakse kvalitatiivseid vaatlusi selliste sümptomite nagu kloroosi, nekroosi ja väärarengute tuvastamiseks.

5. Kemikaali mõju kvantitatiivseks hindamiseks võrreldakse kasvu katselahuses kontrolltaimede kasvuga ning tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures kasv pidurdub teatud kindla protsendi x võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul EC_x, kus x võib olla regulatiivsetest nõuetest sõltuvalt mis tahes väärtusega – nt EC_{10}, EC_{20} või EC_{50}. Tuleks tähele panna, et EC_{10} ja EC_{20} hinnanguline väärtus on usaldusväärne ja asjakohane üksnes sellise katse puhul, kus kontrolltaimi iseloomustav variatsioonikordaja on hinnatava mõju ulatusest väiksem; see tähendab, et EC_{20} usaldusväärseks hindamiseks peaks variatsioonikordaja olema < 20 %.

6. Töödeldud ja töötlemata taimedel tuleks määrata nii keskmine kasvu erikiirus kui ka saagis (kumbagi näitajat hinnatakse võrsete pikkuse, võrsete märgmassi ja võrsete kuivmassi alusel). Leitud kasvu erikiirust (r) ja saagist (y) kasutatakse vastavalt E_rC_x (nt E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) ja E_yC_x (nt E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) määramiseks.

7. Vajaduse korral võib kasvu keskmise erikiiruse ja saagise hinnangulise väärtuse põhjal teha statistiliselt kindlaks vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni ja täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni.

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

8. Analüüsimeetod uuritava kemikaali sisalduse määramiseks katsesöötmes peaks olema piisava tundlikkusega.

9. Katsetingimuste kindlaksmääramiseks võib uuritava kemikaali kohta olla kasulik teada muu hulgas järgmisi andmeid: struktuurivalem, mitut koostisosa sisaldava aine, UVCB, segu või valmistise puhul koostis, puhtus, lahustuvus vees, püsivus vees ja valguse käes, happe dissotsiatsioonikonstant (pK_a), jaotuskoefitsient süsteemis oktanool/vesi (K_{ow}), võimaluse korral settesse kogunemist iseloomustav K_d, aururõhk ja biolagundatavus. Vees lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas uuritava kemikaali märkimisväärne kadu katse ajal on tõenäoline. Kui kemikaali kadu on tõenäoline, tuleks kadu kvantifitseerida ja dokumenteerida järgnevad sammud kao vähendamiseks. Kui puuduvad kindlad andmed uuritava kemikaali lahustuvuse ja püsivuse kohta, soovitatakse hinnata neid omadusi katses kasutatavates tingimustes, st samas söötmes ning sama temperatuuri ja valgusrežiimi juures. *Märkus*: kui katses uuritakse valguse toimel peroksüdeerivat herbitsiidi, peaks laboris kasutatava valguse spekter hõlmama ultraviolettkiirgust samal määral, nagu seda esineb looduslikus päikesekiirguses.

▼M7

10. Tuleks mõõta katsesöötme pH ja seda vastavalt vajadusele reguleerida. Katsesöötme pH reguleerimine on eriti oluline näiteks juhul, kui analüüsitakse metalle või kergesti hüdrolüüsuvaid kemikaale. Täiendavad juhised selliste kemikaalide mõju hindamiseks, mille füüsikalis-keemilised omadused raskendavad nende uurimist, on esitatud asjaomases OECD juhenddokumendis (11).

KATSE NÕUETEKOHASUS

11. Katsetulemused vastavad nõuetele, kui kontrolltaimede võrsete keskmine summaarne pikkus ja keskmine summaarne märgmass suurenevad katse kokkupuuteperioodi jooksul vähemalt kaks korda. Peale selle ei tohi kontrolltaimedel olla näha mingeid kloroosi sümptomeid ning taimed, sette pind ja katsesööde ei tohi olla nähtavalt saastunud muude organismidega, näiteks vetikatega ja/või bakterite kihiga.

12. Võrsete märgmassi (st katse alguses ja katse lõpus saadud väärtuste) alusel arvutatud saagise keskmine paralleelkultuuride vaheline variatsioonikordaja ei tohi kontrollrühmas olla suurem kui 35 %.

VÕRDLUSKEMIKAAL

13. Katsemeetodi töökindluse perioodiliseks kontrollimiseks tuleks kasutada ühte või mitut võrdluskemikaali, näiteks võrdlusuuringus (9) kasutatud 3,5-diklorofenooli. Võrdlusuuringu andmete põhjal jäävad 3,5-diklorofenooli EC_{50} keskväärtused eri uuritavate muutujate puhul vahemikku 4,7–6,1 mg/l (üksikasjalik teave nende väärtuste eeldatava usaldusvahemiku kohta on esitatud võrdlusuuringu aruandes). Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas või kui katseid tehakse harva, siis mürgisuse hindamise lõpliku katsega samaaegselt. Juhised seoses 3,5-diklorofenooli eeldatavate EC_{50} väärtustega on esitatud rahvusvahelise võrdlusuuringu statistikaaruandes (9).

MEETODI KIRJELDUS

Katseseadmed

14. Katse tuleks läbi viia kontrollitavates keskkonnatingimustes, st reguleeritava valgustuse, päeva pikkuse ja temperatuuriga kasvukambris, kasvatusruumis või laboris (vt jaotis „Katsetingimused“: punktid 56–58). Tüvikultuure tuleks hoida katsenõudest eraldi.

15. Katses tuleks kasutada klaasist katsenõusid, näiteks akvaariume või keeduklaase; tavapäraselt kasutatakse 2-liitriseid keeduklaase (kõrgusega umbes 24 cm ja läbimõõduga umbes 11 cm). Võivad sobida ka muud (st suuremad) nõud, kui vesi on neis piisavalt sügav, et võimaldada taimedel katse vältel piiramatult kasvada, ilma et need veest välja ulatuksid.

16. Taimede settesse istutamise jaoks võib kasutada plastist või klaasist taimepotte (kõrgusega umbes 9 cm, läbimõõduga umbes 8 cm ja mahuga umbes 500 ml). Teise võimalusena võib kasutada keeduklaase, mis on mõnel juhul (nt hüdrofoobsete või suure K_{ow}-ga kemikaalide puhul) soovitatavad.

17. Katsenõude ja eelistatud katseplaani (vt allpool) valimise kõrval on vaja pöörata tähelepanu ka õige suurusega poti või keeduklaasi valimisele. Katseplaani A puhul (üks võrse poti kohta ja kolm potti nõu kohta) võib olla vaja kasutada väiksemaid potte. Katseplaani B puhul (kolm võrset poti kohta ja üks pott nõu kohta) peaksid sobima eespool nimetatud suurusega potid ja nõud. Sette kohal oleva vee minimaalne sügavus peaks kõikidel juhtudel olema 12 cm ning tuleks registreerida sette pindala/ruumala ja vee pindala/ruumala suhe.

▼M7

Katseorganism

18. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud üldist lähenemisviisi saab kasutada mitme eri veetaimede liigi puhul. Meetodis sätestatud tingimused on aga välja töötatud vesikuuse liigi *Myriophyllum spicatum*'i jaoks. Nimetatud liik kuulub kaheiduleheliste taimede sugukonda *Haloragaceae*.

19. *Myriophyllum spicatum* (tähk-vesikuusk) on veesisene juurdunud liik, mis talub väga erinevaid tingimusi ja mida leidub nii staatilistes kui ka voolava veega veekogudes. *M. spicatum* on mitmeaastane taim, millest säilivad ületalve vaid juured. Taimed õitsevad ja nende seemned valmivad vabalt, kuid sageli toimub levimine eelkõige vegetatiivse paljunemise teel kaenlapungade abil või varretükkidega, mis eralduvad loomulikul teel või häirimise järgselt.

Katseorganismi kultiveerimine

20. Taimed võib saada looduslikust populatsioonist või veetaimede tarnija kaudu. Kummalgi juhul tuleks taimede päritolu dokumenteerida ja viia läbi liigi kinnitav määramine. *Myriophyllum spicatum*'i kogumisel loodusest tuleks hoolega jälgida, et võetakse õige liigi taimed, eriti piirkonnas, kus see liik võib hübridiseeruda teiste *Myriophyllum*'i liikidega. Kahtluse korral soovitatakse kasutada teadaoleva päritolu ja tõendatud liigilise kuuluvusega laborikultuure. Katses ei tohiks kasutada taimi, mis on olnud kokkupuutes mis tahes keemilise saasteainega või mille kogumiskoht on teadaolevalt saastunud.

21. Piirkonnas, kus *M. spicatum* ei ole talvekuudel hõlpsalt kättesaadav, võib olla vaja säilitada tüvikultuuri pikaajaliselt kasvuhoones või laboritingimustes. Tüvikultuure tuleks säilitada tingimustes, mis sarnanevad katsetingimustele, kuid kiirgustihedus võib olla väiksem ja temperatuur madalam, et vähendada kultuuri hooldamissagedust (nt kui teatava perioodi jooksul ei ole kavandatud katseid *Myriophyllum*'iga). Kasvuruumi jätmiseks soovitatakse kasutada suuremaid akvaariume ja taimepotte kui katses. Sette ja veekeskkonna koostis peaks olema sama kui katses, kuid sette väetamiseks võib rakendada teistsugust meetodit (nt kasutada kaubanduslikku aeglase vabanemisega väetist).

22. Tüvikultuuri taimed ei tohiks olla nähtavalt saastunud ühegi muu organismiga, sealhulgas tigude, niitvetikate, seente või putukatega, näiteks ööliblika *Paraponyx stratiotata* munade või vastsetega või kärsaklase *Eubrychius velutus*'e täiskasvanud isenditega. Nähtava saastuse kõrvaldamiseks võib olla vaja taimset materjali puhta veega loputada. Peale selle tuleks teha jõupingutusi üherakuliste vetikate ja bakteritega saastumise ulatuse minimeerimiseks, ehkki taimne materjal ei pea olema täielikult steriilne. Tüvikultuuri tuleks jälgida ja seda vastavalt vajadusele ümber istutada, et hoida ära vetikatest ja bakteritest põhjustatud saastuse levikut. Kui vetikate või bakteritega saastumine muutub probleemiks, võib olla kasulik tüvikultuuri aereerida.

23. Kõikidel juhtudel kultiveeritakse/kohandatakse taimi enne katses kasutamist piisava ajavahemiku vältel (st üle 2 nädala) tingimustes, mis on sarnased, kuid mitte tingimata identsed katses kasutatavate tingimustega.

24. Katse jaoks ei tohiks kasutada õitsevat tüvikultuuri, kuna vegetatiivse kasvu kiirus on õitsemise ajal ja järel üldjuhul väiksem.

▼M7

Sete

25. Käesoleva meetodi kohases katses soovitatakse kasutada järgmist valmistatud setet, mis põhineb käesoleva lisa peatükis C.28 (8) kirjeldatud kunstlikul settel. Sete valmistatakse katsemeetodis C.28 kirjeldatud viisil; ainsa erinevusena lisatakse toitained järgmiselt:

a) 4–5 % (kuivmass) turvast (orgaanilise süsiniku lõppsisaldus 2 ± 0,5 %), mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; on oluline kasutada üksnes õhu käes kuivatatud peeneks jahvatatud pulbrilist turvast, mille osakeste suurus on soovitatavalt < 1 mm;

b) 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (soovitatav kaoliniidisisaldus üle 30 %);

c) 75–76 % (kuivmass) kvartsliiva (peamiselt peen liiv; > 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm);

d) lisatakse selline kogus toitainete vesilahust, et nii ammooniumkloriidi kui ka naatriumfosfaadi sisaldus valmis settepartiis oleks 200 mg sette kuivmassi kilogrammi kohta ja lõpliku segu niiskusesisaldus oleks 30–50 %;

e) lõpliku settesegu pH reguleerimiseks väärtusele 7,0 ± 0,5 lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$).

26. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada ja dokumenteeritud. Kui mõne nimetatud koostisosa päritolu ei ole teada või teeb teataval määral muret, tuleks veenduda, et asjaomane koostisosa ei ole saastunud kemikaalidega (nt raskmetallide, kloororgaaniliste ühendite või fosfororgaaniliste ühenditega).

27. Sette kuivad koostisosad tuleks esmalt segada homogeensuse saavutamiseks omavahel ja alles siis tuleks settesse hoolikalt segada toitainete vesilahus. Niiske sete tuleks teha valmis vähemalt kaks päeva enne kasutamist, et turvas jõuaks põhjalikult veest läbi imbuda ja hüdrofoobsed turbaosakesed ei kerkiks settele söötme lisamisel veepinnale; niisket setet võib enne kasutamist säilitada pimedas.

28. Katse jaoks viiakse sete sobiva suurusega mahutitesse, näiteks sellise läbimõõduga taimepottidesse, mis võimaldab paigutada potid klaasnõudesse (sette pindala peaks olema minimaalselt umbes 70 % nõu pindalast). Kui mahuti põhjas on augud, aitab mahuti põhja paigutatud filterpaberi tükk setet mahutis hoida. Potid täidetakse settega nii, et sette pind oleks tasane, ja seejärel kaetakse sete selle paigalhoidmiseks inertse materjali, näiteks liiva või peene aianduskruusa (või purustatud korallide) õhukese kihiga (~ 2–3 mm).

Katsesööde

29. *Myriophyllum spicatum*'i kultiveerimiseks ja sellega katsete tegemiseks soovitatakse kasutada Smarti ja Barko söödet (12). Selle söötme valmistamist on kirjeldatud 1. liites. Katsekeskkonna (veefaasi) pH peaks optimaalse taimekasvu tagamiseks olema katse alguses vahemikus 7,5–8,0.

Katseplaan

30. Katses tuleks kasutada kemikaaliga töötlemata kontrolli puhul vähemalt kuut paralleelnõu ja minimaalselt viiest katsekontsentratsioonist iga kontsentratsiooni puhul vähemalt nelja paralleelnõu.

31. Kui ei ole vaja määrata täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni, võib katseplaani muuta nii, et suurendatakse uuritava kemikaali kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelide arvu iga kontsentratsiooni kohta.

▼M7

32. Iga katsenõu näol on tegemist kolme võrset sisaldava paralleelkultuuriga. Igas katsenõus kolme võrse kasvatamiseks on kaks võimalust:

— katseplaan A: üks võrse poti kohta ja kolm potti nõu kohta;

— katseplaan B: kolm võrset poti kohta ja üks pott nõu kohta;

— alternatiivse katseplaanina on lubatud kasutada ühte võrset poti ja nõu kohta, kui seejuures kohandatakse vastavalt vajadusele paralleelide arvu, et saavutada vastavus nõuetekohasuse kriteeriumidele.

33. Katsenõud tuleks jaotada katserühmadesse juhuslikkuse alusel. Katsenõude paigutus katsealal peab olema juhuslik, et vähendada asukohast tingitud valgustiheduse ja temperatuuri erinevuste mõju.

Uuritava kemikaali kontsentratsioonid ja kontrollrühmad

34. Katsekontsentratsioonid peaksid üldjuhul moodustama geomeetrilise jada, mille tegur ei tohiks olla suurem kui 3,2. Uuritava kemikaali sobivate kontsentratsioonide valimine on hõlpsam, kui kemikaali mürgisus on kontsentratsioonivahemiku leidmise katsega eelnevalt kindlaks tehtud.

35. EC_x määramisel peaks EC_x väärtus jääma kasutatavasse kontsentratsioonivahemikku, et tagada tulemuste piisav usaldusväärsus. Näiteks peaks EC_{50} määramisel suurim katsekontsentratsioon olema suurem kui EC_{50} väärtus. Kui EC_{50} väärtus jääb kasutatavast kontsentratsioonivahemikust väljapoole, on asjaomane usaldusvahemik lai ja lähendatud mudeli sobivust katseandmetega ei pruugi olla võimalik statistiliselt hinnata. Leitud EC_x väärtusega seotud kitsama usaldusvahemiku saamiseks tuleks kasutada suuremat arvu katsekontsentratsioone.

36. Valikulise lõppnäitajana vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni või täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks peaks väikseim katsekontsentratsioon olema piisavalt väike, et kasv ei erineks selle kontsentratsiooni juures oluliselt kontrolltaimede kasvust. Peale selle peaks suurim katsekontsentratsioon olema piisavalt suur, et kasv oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Suurema arvu paralleelide kasutamine suurendab täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks kasutatava dispersioonanalüüsi (ANOVA) statistilist võimsust.

Piirsisalduskatse

37. Kui kontsentratsioonivahemiku leidmise katsest selgub, et uuritav kemikaal ei avalda kontsentratsioonil kuni 100 mg/l või katsesöötmes lahustuvuse piirkontsentratsioonil või valmistise puhul dispergeeruvuse piirkontsentratsioonil kahjulikku mõju, võib teha piirsisalduskatse, mille abil on hõlbus võrrelda kasvu kontrollrühmas ja ühes katserühmas, kus kemikaal esineb kontsentratsioonis 100 mg/l või lahustuvuse piirkontsentratsioonis või kontsentratsioonis 1 000 mg kuiva sette kilogrammi kohta. Kõnealuse katse puhul tuleks järgida standardse kontsentratsioonist sõltuvuse katse üldpõhimõtteid; ainsa erinevusena soovitatakse suurendada minimaalset paralleelide arvu kuue katsenõuni kontrollrühma ja katserühma kohta. Kasvu analüüsimiseks kontroll- ja katserühmas võib keskväärtusi võrrelda statistilise testi (nt Studenti t-testi) abil.

Katselahused

38. Katselahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel; viimane saadakse uuritava kemikaali lahustamisel või dispergeerimisel Smarti ja Barko söötmes, mille valmistamiseks on kasutatud demineraliseeritud (st destilleeritud või deioniseeritud) vett (vt 1. liide).

▼M7

39. Suurim katsekontsentratsioon ei tohiks üldjuhul olla suurem kui uuritava kemikaali vees lahustuvuse piirkontsentratsioon või valmistise puhul dispergeeruvuse piirkontsentratsioon katsetingimustes.

40. Vees raskesti lahustuva kemikaali puhul võib olla vaja kasutada selle kemikaali kontsentreeritud põhilahuse või dispersiooni valmistamiseks orgaanilist lahustit või dispergeerivat ainet, et hõlbustada uuritava kemikaali täpse koguse lisamist katsesöötmesse ja soodustada kemikaali lahustumist või dispergeerumist. Tuleks teha kõik selleks, et selliseid lahusteid või dispergeerivaid aineid ei oleks vaja kasutada. Lisatav lahusti või dispergeeriv aine ei tohiks olla fütotoksiline. Tavaliselt kasutatavad lahustid, mis kuni kontsentratsioonini 100 µl/l ei ole fütotoksilised, on näiteks atsetoon ja dimetüülformamiid. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamise korral tuleks esitada selle lõppkontsentratsioon, mis peaks olema võimalikult väike (≤ 100 µl/l). Sellisel juhul peaks lahusti või dispergeeriva aine sisaldus olema kõikides katsenõudes ja (lahustiga) kontrollnõudes ühesugune. Katseplaaniga nähakse ette ka lahustit või dispergeerivat ainet mittesisaldavate kemikaaliga töötlemata kontrollrühma paralleelide kasutamine. Täiendavad juhised dispergeeriva aine kasutamise kohta on esitatud asjaomases OECD juhenddokumendis (11).

KATSE KÄIK

41. Katse käik varieerub sõltuvalt uuritava kemikaaliga kokkupuutumise viisist (st veefaasi või settefaasi kaudu). Katses kasutatava kokkupuuterežiimi valimisel (st staatiline või uuendamisega poolstaatiline, rikastatud vesi või rikastatud sete) tuleks kaaluda uuritava kemikaali eeldatavat käitumist süsteemis vesi/sete. Mõnel juhul, kui kemikaal koguneb eeldatavalt olulisel määral settesse, võib olla soovitatav teha katse rikastatud settega.

Ettevalmistusetapp

42. Kultiveeritud taimede küljest lõigatakse terved võrsetipud ilma külgharudeta, et saada 6 ± 1 cm pikkused võrsed. Katseplaani A puhul (üks võrse poti kohta ja kolm potti nõu kohta) istutatakse igasse potti üks võrsetipp. Katseplaani B puhul (kolm võrset poti kohta ja üks pott nõu kohta) istutatakse igasse setet sisaldavasse potti neli kuni viis võrsetippu.

43. Kummalgi juhul tuleks istutada taimed suuremasse arvu pottidesse kui katse jaoks vajalik, et katse alguses oleks võimalik valida ühesugused taimed ning et ülejäävaid taimi saaks kasutada juurte kasvu kontrollimiseks vahetult enne kemikaaliga kokkupuudet ja võrsete biomassi ja pikkuse määramiseks katse nullpäeval.

44. Võrsed istutatakse nii, et võrsest umbes kolme sentimeetri pikkune osa, mis sisaldab vähemalt kahte sõlme, jääb sette pinnast allapoole.

45. Seejärel viiakse potid katsenõudesse, milles valitsevad keskkonnatingimused on samad kui kokkupuuteetapi ajal, ning hoitakse neid juurekasvu esilekutsumiseks seitse päeva Smarti ja Barko söötmes.

46. Pärast seda tuleks varupottidest eemaldada mitu taime juurte kasvu kontrollimiseks. Kui nähtav juurekasv puudub (st juuretipud ei ole näha), tuleks ettevalmistusetappi pikendada, kuni täheldatakse nähtavat juurekasvu. Selle soovitatava sammuga tagatakse, et taimed kasvavad katse alustamise ajal aktiivselt.

▼M7

Ühetaolise taimse materjali valimine

47. Katseplaani A puhul (üks võrse poti kohta ja kolm potti nõu kohta) valitakse enne katse algust välja ühesuguste taimedega potid. Katseplaani B puhul (kolm võrset poti kohta ja üks pott nõu kohta) eemaldatakse üleliigsed taimed nii, et kolm allesjäävat taime oleksid ühesuguse suuruse ja välimusega.

Kokkupuude veefaasi kaudu

48. Ühesuguste taimede alusel välja valitud potid paigutatakse konkreetsest katseplaanist lähtuvalt katsenõudesse. Seejärel lisatakse katsenõudesse Smarti ja Barko sööde. Tuleks jälgida, et selle käigus ei häiritaks settekihti. Selleks võib söötme lisamisel kasutada lehtrit või katta sette söötme katsenõudesse valamise ajal plastkettaga, mis eemaldatakse kohe pärast söötme lisamist. Teise võimalusena võib taimepotid panna katsenõudesse pärast söötme lisamist. Kummalgi juhul võib kokkupuuteetapi alguses kasutada värsket söödet, kui see on vajalik võimaliku vetikate ja bakterite kogunemise minimeerimiseks või selleks, et võimaldada valmistada katselahuse partii korraga kõikide paralleelide jaoks.

49. Sette kohal oleva võrse pikkus mõõdetakse kas enne või pärast söötme lisamist.

50. Katsesöötmesse võib sobiva koguse uuritavat kemikaali lisada enne söötme viimist katsenõudesse. Teise võimalusena võib uuritava kemikaali lisada pärast seda, kui sööde on lisatud katsenõudesse. Viimasel juhul tuleks tagada uuritava kemikaali ühtlane jaotumine katsesüsteemis ilma setet häirimata.

51. Kõikidel juhtudel registreeritakse katse alguses katsesöötme välimus (nt selge, hägune vmt).

Kokkupuude sette kaudu

52. Valitud kontsentratsiooniga rikastatud sete valmistatakse uuritava kemikaali lahuse otse värskesse settesse lisamise teel. Deioniseeritud vees lahustatud uuritava kemikaali põhilahus segatakse valmistatud settega rullimisseadme või söödasegaja abil või käsitsi. Vees raskesti lahustuva uuritava kemikaali võib lahustada võimalikult väikeses koguses sobivas orgaanilises lahustis (nt heksaanis, atsetoonis või kloroformis). Seejärel segatakse saadud lahus umbes 10 g peene kvartsliivaga ühe katsenõu kohta. Lahustil lastakse aurustuda ja seejärel segatakse liiv sobiva koguse settega katses kasutatava keeduklaasi kohta. Uuritava kemikaali lahustuvaks muutmiseks, dispergeerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada üksnes kergesti lenduvat kemikaali. Tuleks meeles pidada, et lõpliku sette valmistamisel on vaja arvesse võtta ka uuritava kemikaaliga rikastatud liiva ruumala/massi (seega tuleks sette valmistamisel kasutada vähem liiva). Tuleks jälgida, et settele lisatav uuritav kemikaal seguneks settega põhjalikult ja jaotuks selles ühtlaselt.

53. Rikastatud sete lisatakse pottidesse (nagu on kirjeldatud eespool). Välja valitud ühesugused piisava juurestikuga taimed eemaldatakse ettevalmistusetapis kasutatud pottidest ja istutatakse eespool kirjeldatud viisil ümber rikastatud settesse.

54. Potid paigutatakse konkreetsest katseplaanist lähtuvalt katsenõudesse. Seejärel lisatakse ettevaatlikult Smarti ja Barko sööde (nt lehtri abil), häirimata seejuures setet. Sette kohal oleva võrse pikkus mõõdetakse kas enne või pärast söötme lisamist.

▼M7

Veetaseme säilitamine katse vältel

55. Igas katsenõus tuleb registreerida vee lõplik ruumala ja märkida nõule veetase. Kui katse vältel aurustub üle 10 % veest, tuleks veetaset destilleeritud veega reguleerida. Vajaduse korral võib keeduklaasid katta lahtise läbipaistva kattega, näiteks läbipaistvast plastist kaanega, et minimeerida aurustumist ja vetikate spooridega saastumist.

Katsetingimused

56. Kasutatakse päevavalguse spektriga ja/või külmvalget fluorestsentsvalgust, mille valgustihedus on umbes 140 (± 20) µE m^{-2} s^{-1}, mõõdetuna fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus (400–700 nm) veepinnal. Kohaldatakse valgustusrežiimi 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust. Kõrvalekalle valitud valgustihedusest ei tohi katseala üheski punktis olla suurem kui ± 15 %.

57. Temperatuur katsenõudes on 20 ± 2 °C.

58. Kontrollsöötme pH väärtus ei tohiks katse ajal suureneda rohkem kui 1,5 ühiku võrra. Kui pH väärtus suureneb üle 1,5 ühiku võrra, ei loeta katset siiski nõuetele mittevastavaks, kui on võimalik tõendada, et eespool sätestatud nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud.

Katse kestus

59. Kokkupuuteperiood kestab 14 päeva.

Mõõtmised ja analüüsid

60. Ettevalmistusetapi järel ja vahetult enne kemikaaliga kokkupuudet (st katse nullpäeval) kogutakse varutaimed viiest juhuslikult valitud potist, kui potis on katseplaani kohaselt kolm taime, või 15 potist, kui potis on üks taim, ning tehakse kindlaks võrsete pikkus, märgmass ja kuivmass, nagu on kirjeldatud allpool.

61. Kokkupuuteetapi jaoks kasutavate taimede puhul määratakse järgmised tabelis 1 esitatud näitajad:

— peavõrse pikkus, külgharude arv ja külgharude pikkus registreeritakse vähemalt kokkupuuteperioodi lõpus (st 14. katsepäeval);

— taimede tervise visuaalse hindamise tulemused registreeritakse kokkupuuteperioodi jooksul vähemalt kolmel korral (nt nullpäeval ning 7. ja 14. päeval);

— võrsete märgmass ja kuivmass määratakse katse lõpus (st 14. päeval).

62. Võrsete pikkust mõõdetakse joonlauaga. Külgharude esinemise korral tuleks kindlaks teha ka nende arv ja pikkus.

63. Taimede tervise visuaalseks hindamiseks registreeritakse nende väljanägemine ja katsesöötme üldseisund. Vaatlused hõlmavad järgmist:

— nekroos, kloroos või muu värvimuutus, näiteks liigne punaseks värvumine kontrolltaimedega võrreldes;

— bakteritest või vetikatest põhjustatud saastuse teke;

— kasvuhäired, näiteks kängumine, sõlmedevahelise pikkuse muutumine, võrsete/lehtede moondumine, külgharude juurdekasv, lehtede langemine, turgori kadu või varre fragmenteerumine;

▼M7

— juurte tervist hinnatakse visuaalselt katse lõpus; selleks pestakse sete juurtelt ettevaatlikult maha ja vaadeldakse seejärel juurestikku. On välja pakutud järgmine hindamisskaala võrdluses kontrolltaimedega:

1) juured puuduvad,

2) mõned juured,

3) mõõdukalt arenenud juurestik,

4) väga hästi välja kujunenud juurestik, mis sarnaneb kontrolltaimede omale.

64. Märgmass määratakse katse alguses ja lõpus; selleks lõigatakse sette pinna kohal olev võrse osa ära ja kuivatatakse see enne kaalumist kuivatuspaberiga. Tuleks jälgida, et võrse alumise otsa külge kleepuda võivad setteosakesed saaksid eemaldatud. Seejärel pannakse võrse kuivatuskappi temperatuurile umbes 60 °C ja kuivatatakse seda, kuni selle mass enam ei muutu, ning kaalutakse siis võrse uuesti ja registreeritakse selle kuivmass.

65. Katse vältel minimaalselt nõutavate bioloogiliste hindamiste kokkuvõte on esitatud tabelis 1.

Tabel 1

Hindamiste ajakava

Päevade arv kokkupuute algusest	*Myriophyllum spicatum*			
	Võrse pikkus, külgharude pikkus ja arv	Võrsete visuaalne hindamine	Võrsete märgmass ja kuivmass Juurte visuaalne hindamine	pH O_2
0	H	H	H	H
4	—	—	—	—
7	—	H	—	H
14	H	H	H	H

„H“ tähistab asjaomase hindamise vajalikkust
„—“ tähistab hindamisvajaduse puudumist

Mõõtmiste ja analüüside sagedus

66. Söötme temperatuur kasvukambris, inkubaatoris või ruumis samades tingimustes hoitavas lisanõus tuleks registreerida vähemalt üks kord päevas (või teha seda andmeregistraatori abil pidevalt).

67. Katsesöötme pH-d ja lahustunud hapniku sisaldust kontrollitakse katse alguses, vähemalt üks kord katse vältel ja katse lõpus kõikides paralleelnõudes. Mõõtmised tuleks iga kord teha samal kellaajal. Kui iga katsekontsentratsiooni puhul valmistatakse katselahus korraga kõikide paralleelide jaoks, piisab iga sellise lahuse puhul ühekordsest mõõtmisest katse nullpäeval.

68. Valgustihedust tuleks mõõta kasvukambri, inkubaatori või ruumi punktides, mis on valgusallikast samal kaugusel kui veepind. Valgustihedus tuleks kindlaks teha vähemalt üks kord katse alguses või katse jooksul. Valgustugevuse mõõdetav väärtus sõltub mõõtmismeetodist ja eelkõige anduri tüübist.

▼M7

Ühest suunast saabuvale valgusele reageeriva anduri asemel soovitatakse kasutada kerakujulist andurit, mis reageerib nii ülalt- kui ka altpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele, või koosinusandurit, mis reageerib ülaltpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele; sellise anduriga saadakse käesolevas meetodis kirjeldatud mitmepunktilise valgusallika puhul suuremad väärtused.

Uuritava kemikaali sisalduse analüütiline mõõtmine

69. Uuritava kemikaali õige koguse lisamises veendumiseks tuleks läbi viia kemikaali sisalduse analüütiline mõõtmine.

70. Veeproovid uuritava kemikaali analüüsimiseks kõikidel katsekontsentratsioonidel tuleks koguda veidi aega pärast katse algust (st püsiva uuritava kemikaali puhul selle lisamise päeval ja ebapüsiva kemikaali puhul üks tund pärast lisamist) ja katse lõpus.

71. Kemikaali sisaldus settes ja settepoorides olevas vees tuleks määrata katse alguses ja katse lõpus vähemalt suurimal katsekontsentratsioonil, välja arvatud juhul, kui uuritav kemikaal on vees teadaolevalt püsiv (sisaldus > 80 % nominaalväärtusest). Mõõtmised settes ja settepoorides olevas vees ei pruugi olla vajalikud, kui uuritava kemikaali jaotumine vee ja sette vahel on näiteks sette ja vee suhte, kemikaali lisamise meetodi ja sette tüübi poolest võrreldavates tingimustes süsteemis vesi/sete läbi viidud uuringu käigus täpselt kindlaks tehtud.

72. Setteproovi võtmisega katse alguses kaasneb tõenäoliselt katsesüsteemi häirumine. Seepärast võib olla vaja kasutada täiendavaid kemikaaliga katsenõusid, et hõlbustada analüütilist määramist katse alguses ja lõpus. Kui peetakse vajalikuks teha vahehindamisi näiteks 7. katsepäeval ja analüüsiks vaja mineva proovi kogus on nii suur, et seda ei ole lihtne katsesüsteemist eemaldada, tuleks samuti kasutada analüütiliseks määramiseks täiendavaid katsenõusid, mida on käideldud samal viisil kui bioloogiliste hindamiste jaoks kasutatavaid nõusid.

73. Poorivee eraldamiseks soovitatakse kasutada tsentrifuugimist näiteks 30 minuti vältel 10 000 *g* ja 4 °C juures. Kui on tõendatud, et uuritav kemikaal ei adsorbeeru filtril, võib siiski olla vastuvõetav ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi kemikaali sisalduse määramine poorivees proovi liiga väikese mahu tõttu võimalik olla.

74. Poolstaatilise katse puhul (st veefaasi kaudu kokkupuutel), kus asjaomase uuritava kemikaali sisaldus ei püsi katse vältel katselahust uuendamata eeldatavalt vahemikus ± 20 % nominaalsest kontsentratsioonist, tuleks igal uuendamisel võtta uuritava kemikaali sisalduse määramiseks proov nii ärakasutatud kui ka värskelt valmistatud katselahusest.

75. Kui uuritava kemikaali mõõdetud algsisaldus erineb nominaalväärtusest enam kui 20 % võrra, kuid on olemas piisavad tõendid selle kohta, et algsisaldus on korratav ja asjaomane väärtus on püsiv (st püsib vahemikus 80–120 % algsisaldusest), võib kemikaali sisalduse määrata ainult suurimal ja väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil.

76. Kõikidel juhtudel on uuritava kemikaali sisaldus igal katsekontsentratsioonil vaja määrata ainult ühes paralleelnõus. Teise võimalusena võib igal kontsentratsioonil kõikide paralleelide katselahused analüüsimiseks ühte koondada.

77. Kui on tõendatud, et uuritava kemikaali sisaldus ei kõigu katse vältel nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtusega võrreldes rohkem kui ± 20 %, võib tulemuste analüüsimisel ja järgneval lõppnäitajate arvutamisel võtta aluseks nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtuse.

▼M7

78. Sellisel juhul peaksid mõju avaldumise kontsentratsioonid põhinema nominaalsetel või katse alguses vees mõõdetud kontsentratsioonidel.

79. Kui aga on tõendeid selle kohta, et kontsentratsioon on katse vältel vähenenud (st ei ole püsinud uuritava kemikaaliga töödeldud faasis vahemikus ± 20 % nominaalväärtusest või mõõdetud algväärtusest), tuleks võtta tulemuste analüüsimisel aluseks kokkupuute vältel esinenud väärtuste geomeetriline keskmine või mõni mudel, millega saab kirjeldada uuritava kemikaali sisalduse vähenemist töödeldud faasis (11).

ANDMETE HINDAMINE

80. Kui katses on vaja kasutada lahustit või dispergeerivat ainet, võib lahustiga kontrolli ja töötlemata kontrolli andmed statistilise analüüsi jaoks ühte koondada, eeldusel, et kõnealuste rühmade näitajate vahel ei täheldata statistiliselt olulisi erinevusi.

Uuritavad muutujad

81. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju katseliigi vegetatiivsele kasvule kahe uuritava muutuja – kasvu keskmise erikiiruse ja saagise – põhjal järgmisel viisil.

Keskmine kasvu erikiirus

82. See uuritav muutuja põhineb kontrollrühma(de)s ja igas katserühmas mõõdetud võrsete summaarse pikkuse, summaarse märgmassi ja summaarse kuivmassi logaritmitud väärtuste muutumisel ajas. Kõnealune muutuja arvutatakse iga kontroll- ja katserühma iga paralleeli kohta. Igas katsenõus (paralleelnõus) oleva kolme taime keskmine pikkus ja mass ning sellest lähtuvalt kasvukiirus iga paralleelis tuleks arvutada järgmise valemi abil:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kus

μ_{i-j} on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul i–j,

N_i on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel i,

N_j on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel j ja

t on ajavahemik i–j.

83. Paralleelnõude andmete põhjal tuleks iga katserühma ja kontrollrühma puhul arvutada kasvukiiruse keskväärtus ja tulemuste hajuvus.

84. Keskmine kasvu erikiirus tuleks arvutada kogu katseperioodi kohta (eespool esitatud valemis vastab katse algusele ajahetk i ja katse lõpule ajahetk j). Kontrollrühma ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse kasvu keskmise erikiiruse keskväärtus ja tulemuste hajuvus.

▼M7

85. Seejärel võib iga katses kasutatava kontsentratsiooni (katserühma) puhul arvutada kasvukiiruse vähenemise I_r protsentides järgmise valemi abil:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kus

% I_r on kasvu keskmise erikiiruse vähenemise määr protsentides,

μ_C on μ keskväärtus kontrollrühmas ja

μ_T on μ keskväärtus katserühmas.

Saagis

86. See uuritav muutuja põhineb kontrollrühma(de)s ja igas katserühmas mõõdetud võrsete summaarse pikkuse, summaarse märgmassi ja summaarse kuivmassi muutumisel ajas. Saagise vähenemise määra protsentides (% I_y) võib iga katserühma puhul arvutada järgmiselt:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

kus

% I_y on saagise vähenemise määr protsentides,

b_C on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe kontrollrühmas ja

b_T on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe katserühmas.

Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverate koostamine

87. Tuleks koostada kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverad, mis väljendavad uuritava muutuja väärtuse vähenemise keskmise protsentuaalse määra (eespool kirjeldatud viisil arvutatud % I_r või % I_y) sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsiooni logaritmitud väärtusest.

EC_x leidmine

88. EC_x (nt EC_{50}) hinnanguliste väärtuste leidmisel tuleks lähtuda nii keskmisest kasvu erikiirusest (E_rC_x) kui ka saagisest (E_yC_x), mis peaksid kumbki omakorda põhinema võrsete summaarsel märgmassil, summaarsel kuivmassil ja summaarsel pikkusel.

89. Tuleks silmas pidada, et nende kahe uuritava muutuja puhul arvutatud EC_x väärtused ei ole võrreldavad, ning seda erinevust võetakse katsetulemuste kasutamisel arvesse. Käesolevas katsemeetodis sätestatud tingimuste kohase katse puhul on keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad EC_x väärtused (E_rC_x) enamikul juhtudel suuremad kui saagisel põhinevad väärtused (E_yC_x), kuna asjaomaste lähenemisviiside matemaatiline alus on erinev. Seda erinevust ei tohiks tõlgendada kahe kõnealuse uuritava muutuja tundlikkuse erinevusena; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad.

Statistilised meetodid

90. Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. On võimalik kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast mõjuandmete lineariseerivat teisendamist näiteks vastavalt probit-, logit- või Weibulli mudelile (13), kuid tuleks siiski eelistada mittelineaarse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kasvu täielikule pidurdumisele või pidurdumise täielikule puudumisele lähedases olukorras võib kõnealune teisendamine andmevigu võimendada ja analüüsi segada (13). Tuleks silmas

▼M7

pidada, et probit-, logit- või Weibulli teisendusel põhinevad standardsed analüüsimeetodid on ette nähtud binaarsete tunnuste (nt suremus või elulemus) analüüsimiseks ning neid tuleks kasvukiiruse või saagise andmete analüüsimiseks kohandada. Konkreetsed meetodid EC_x väärtuste leidmiseks pidevate andmete alusel on esitatud viidetes 14–17.

91. Iga uuritava muutuja puhul arvutatakse kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera põhjal EC_x hinnanguline väärtus. Määratakse iga hinnangulise väärtuse usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Mõjuandmete sobivust regressioonimudeliga tuleks hinnata graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsi tegemisel tuleks kasutada mitte katserühmade andmete keskväärtusi, vaid igas üksikus paralleelkultuuris saadud väärtusi.

92. Kui olemasolevad regressioonimudelid ja -meetodid ei ole katseandmete jaoks sobivad, võib EC_{50} hinnangulise väärtuse ja usalduspiiride leidmiseks kasutada ka lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (18).

93. Et teha kindlaks vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ja selle alusel ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon, on vaja võrrelda katserühmade keskväärtusi dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetoditega. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskväärtust võrreldakse seejärel sobiva meetodi (nt Dunnetti või Williamsi testi) abil kontrollrühma keskväärtusega (19–22). Tuleb hinnata, kas kehtivad dispersioonanalüüsi eeldused, et tegemist on normaaljaotusega ja hajuvus on homogeenne. Selleks tuleks kasutada Shapiro-Wilksi testi (normaaljaotus) ja Levene'i testi (hajuvuse homogeensus). Kui normaaljaotuse ja hajuvuse homogeensuse eeldused ei kehti, võib mõnikord olla abi andmete logaritmilisest teisendamisest. Kui hajuvuse heterogeensus ja/või kõrvalekalle normaaljaotusest on väga suur(ed) ja teisendamise abil korrigeerimine ei ole võimalik, tuleks kaaluda mõne muu meetodi, näiteks Bonferroni-Welchi t-testi, muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra testi või Bonferroni mediaantesti kasutamist. Lisajuhised täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks on esitatud viites 16.

ARUANDLUS

94. Katseprotokollis esitatakse järgmine üksikasjalik teave.

Uuritav kemikaal:

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus, nt koostisosade keemiline määratlus (vt eespool), kvantitatiivne sisaldus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused.

Katseliik:

— teaduslik nimetus ja päritolu.

Katsetingimused:

— ettevalmistusetapi kestus ja tingimused;

— kasutatud katserežiim (staatiline, poolstaatiline või impulssdoseerimise režiim);

▼M7

— katse alustamise kuupäev ja katse kestus;

— katsekeskkonna, st sette ja vedelsöötme kirjeldus;

— katseplaani kirjeldus: kasvukamber, ruum või labor, katsenõud ja nende katted, lahuste ruumala, katsetaimede pikkus ja mass igas katsenõus katse alguses, sette pindala ja vee pindala suhe, sette ruumala ja vee ruumala suhe;

— kasutatud kontsentratsioonid (nominaalne ja vajaduse korral mõõdetud sisaldus) ja paralleelkultuuride arv kontsentratsiooni kohta;

— põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, sh lahustite või dispergeerivate ainete kasutamise kirjeldus;

— katsetemperatuur;

— valgusallikas ja valgustihedus (μE m^{-2} s^{-1});

— katsesöötme ja kontrollsöötme pH ning katsesöötme välimus katse alguses ja lõpus;

— hapnikusisaldus;

— kemikaali määramise meetod ja asjakohased kvaliteedihindamise andmed (valideerimisuuringud, analüüsiandmete standardhälbed või usaldus-piirid);

— mõõdetavate muutujate, näiteks pikkuse, kuivmassi ja märgmassi määramise meetodid;

— kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist.

Tulemused:

— töötlemata andmed: taimede võrsete pikkus ja mass poti kohta ning muude mõõdetavate muutujate väärtus igas uuritava kemikaaliga kultuuris ja kontrollkultuuris iga tabelis 1 esitatud ajakava kohase vaatluse ja analüüsi ajal;

— iga mõõdetava muutuja keskväärtused ja standardhälbed;

— kasvukõver igal kontsentratsioonil;

— võrsete pikkuse ja märgmassi alusel arvutatud biomassi kahekordistumise aeg ja kasvukiirus kontrollrühmas, sealhulgas märgmassil põhineva saagise variatsioonikordaja;

— uuritavate muutujate arvutatud väärtused igas uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris ning paralleelkultuuride andmete keskväärtused ja variatsioonikordajad;

— kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;

— uuritavate muutujate põhjal leitud mürgisuse lõppnäitajate, näiteks EC_{50} hinnangulised väärtused ja vastavad usaldusvahemikud; asjaomaste andmete olemasolu korral vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ja/või täheldatava toime puudumise kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;

— dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamise korral mõju määr, mida on võimalik tuvastada (nt väikseim oluline erinevus);

— katserühma mis tahes kultuuris täheldatud stimuleeriv mõju kasvule;

▼M7

— kõik nähtavad fütotoksilisuse ilmingud ja tähelepanekud katselahuste kohta;

— tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

(1) Käesoleva lisa peatükk C.26 „Perekonna *Lemna* taimede kasvu pidurdumise katse“.

(2) Käesoleva lisa peatükk C.3 „Mageveevetikate ja tsüanobakterite kasvu pidurdumise katse“.

(3) Maltby, L., *et al.* (2010). Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides. Suunised AMRAPi seminarilt Wageningenis (NL), 14.–16. jaanuar 2008.

(4) Arts, G. H. P., *et al.* (2008). Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environ. Pollut.* 153: 199–206.

(5) ISO 16191:2013. Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.

(6) Knauer, K., *et al.* (2006). Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants. *Pest Manag. Sci.* 62 (8): 715–722.

(7) Käesoleva lisa peatükk C.50 „Settevaba mürgisuskatse *Myriophyllum spicatum*'iga“.

(8) Käesoleva lisa peatükk C.28 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud vee kasutamisega“.

(9) Ratte, M., ja Ratte, H. (2014). *Myriophyllum* Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 206. OECD Publishing, Pariis.

(10) Davies, J., *et al.* (2003). Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study. *Pest Manag. Sci.* 59 (2): 231–237.

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 23. OECD Publishing, Pariis.

(12) Smart, R. M., ja Barko, J. W. (1985). Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments. *Aquat. Bot.* 21 (3): 251–263.

(13) Christensen, E. R., ja Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Environ. Sci. Technol.* 18 (9): 713–718.

(14) Nyholm, N., *et al.* (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (2): 157–167.

(15) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (10): 1485–1494.

(16) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 54. OECD Publishing, Pariis.

(17) Brain, P., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res.* 29 (2): 93–96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50 (272): 1096–1121.

(20) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20 (3): 482–491.

(21) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27 (1): 103–117.

(22) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28 (2): 519–531.

▼**M7**

1. liide

SMARTI JA BARKO SÖÖTME KOOSTIS

Koostisaine	Veele (*) lisatava reaktiivi kogus (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (õhuga tasakaalus lahus)	7,9

(*) Demineraliseeritud (st destilleeritud või deioniseeritud) vesi

▼M7

2. liide

MÕISTED

Biomass – populatsiooni elusaine märgmass ja/või kuivmass. Käesoleva katsemeetodi puhul on biomass peavõrse, kõikide külgharude ja kõikide juurte summaarne mass.

Kemikaal – aine või segu.

Kloroos – katseorganismi, eriti männaste rohelise värvuse muutumine kollakaks.

EC_x – katsesöötmes lahustatud uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul *Myriophyllum spicatum*'i kasv pidurdub kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul x % (nt 50 %) võrra (kui kokkupuuteaeg erineb katse tavapärasest või täiskestusest, tuleb täpselt märkida selle kestus). Kasvukiiruse või saagise alusel arvutatava EC väärtuse üheselt arusaadavaks tähistamiseks kasutatakse kasvukiiruse puhul tähist „E_rC“ ja saagise puhul tähist „E_yC“, mille järel märgitakse kasutatud mõõdetav muutuja, nt „E_rC (peavõrse pikkus)“.

Kasv – mõõdetava muutuja (nt peavõrse pikkuse, külgharude summaarse pikkuse, võrsete summaarse pikkuse, juurte summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi või männaste arvu) väärtuse suurenemine katse vältel.

Kasvukiirus (keskmine kasvu erikiirus) – mõõdetava muutuja väärtuse logaritmiline suurenemine kokkupuuteperioodi jooksul. *Märkus*: kasvukiirusega seotud uuritavad muutujad ei sõltu katse kestusest, kuni kemikaaliga mitte kokku puutuvate kontrollorganismide kasv on eksponentsiaalne.

Vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon – väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ($p < 0,05$) kasvu pidurdavat mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peaks kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon) on valitud.

Mõõdetav muutuja – mis tahes liiki muutuja, mida mõõdetakse katse lõppnäitaja väljendamiseks ühe või mitme eri uuritava muutuja kaudu. Käesoleva katsemeetodi puhul on mõõdetavad muutujad peavõrse pikkus, külgharude summaarne pikkus, võrsete summaarne pikkus, juurte summaarne pikkus, märgmass, kuivmass ja männaste arv.

Monokultuur – ühe liigi taimede kultuur.

Nekroos – protsess, mille tagajärjel tekib katseorganismi surnud (st valge või tumepruun) kude.

Täheldatava toime puudumise kontsentratsioon – kontsentratsioon, mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni.

Uuritav muutuja – mürgisuse hindamiseks kasutatav muutuja, mis on leitud biomassi kirjeldava mõõdetud muutuja alusel vastavalt asjakohasele arvutusmeetodile. Käesoleva katsemeetodi puhul on uuritavad muutujad kasvukiirus ja saagis, mis on leitud selliste mõõdetavate muutujate alusel nagu peavõrse pikkus, võrsete summaarne pikkus, märgmass, kuivmass või männaste arv.

Poolstaatiline (lahusevahetusega) katse – katse, mille käigus katselahus teatavate ajavahemike järel perioodiliselt välja vahetatakse.

Staatiline katse – katse, mille käigus katselahust ei uuendata.

▼M7

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Katse lõppnäitaja – katse eesmärgile vastav üldine näitaja, mis muutub uuritava kemikaali mõjul kontrollrühma asjaomase näitajaga võrreldes. Käesoleva katsemeetodi puhul on katse lõppnäitaja kasvu pidurdumine, mida võib väljendada ühel või mitmel mõõdetaval muutujal põhinevate uuritavate muutujate abil.

Katsesööde – täielik sünteetiline kasvukeskkond, milles katsetaimi kasvatatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav kemikaal katsesöötmes.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Saagis – kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetava muutuja väärtuste vahe, mille kaudu väljendatakse biomassi suurenemist katse vältel. *Märkus*: kui kemikaaliga mitte kokku puutuvate organismide kasv on eksponentsiaalne, muutub saagisel põhinevate uuritavate muutujate väärtus katse vältel väiksemaks.

▼M8

C.52. ÜHTE PÕLVKONDA HÕLMAV PIKENDATUD SIGIVUSKATSE JAAPANI RIISIKALAGA (MEOGRT)

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 240 (2015). Jaapani riisikalaga tehtava ühte põlvkonda hõlmava pikendatud sigivuskatse (MEOGRT) juhendis kirjeldatakse põhjalikku katsemeetodit, mille aluseks on kalade kokkupuude kemikaaliga mitme põlvkonna jooksul, et koguda ökoloogilise ohu ja kemikaalide, sealhulgas võimalikud endokriinfunktsiooni kahjustavad kemikaalid, riskihindamise aspektist olulisi andmeid. MEOGRT puhul kestab kokkupuude kemikaaliga kuni teise põlvkonna (F2) koorumiseni (kaks nädalat pärast viljastamist). Täiendavalt oleks vaja uurida seda, kas põlvkonna F2 uurimine koorumisjärgsel perioodil oleks põhjendatud; praegu ei ole piisavalt teavet, mille põhjal saaks esitada põlvkonna F2 uurimise pikendamist põhjendavaid asjakohaseid tingimusi või kriteeriume. Käesolevat katsemeetodit võidakse siiski uue teabe ja andmete põhjal ajakohastada. Näiteks võivad juhised põlvkonna F2 uurimise pikendamiseks kuni sigimiseni olla kasulikud teatud asjaoludel (nt suure biokontsentratsiooni potentsiaaliga kemikaalid või andmed põlvkondadevahelise toime kohta muudes taksonites). Käesoleva katsemeetodi abil saab hinnata kemikaalide, sealhulgas potentsiaalselt endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide võimalikku kroonilist toimet kaladele. Meetodis keskendutakse eelkõige võimalikule populatsiooni mõjutavale toimele (kahjulik mõju ellujäämusele, arengule, kasvule ja sigimisele), et arvutada täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) või toimet avaldav kontsentratsioon (ECx), kuid tuleks arvesse võtta, et ECx-il põhinevad meetodid ei sobi tavaliselt sellist tüüpi suurte uuringute jaoks, kus ECx-i kindlakstegemise eesmärgil uuritavate kontsentratsioonide arvu suurendamine võib olla ebaotstarbekas ja põhjustada kasutatavate loomade suure arvu tõttu loomade heaoluga seotud probleeme. Kemikaalide puhul, mis ei vaja mitmes põlvkonnas hindamist või millel puudub endokriinfunktsiooni kahjustamise potentsiaal, võivad olla sobivamad muud katsemeetodid (1). Jaapani riisikala on käesoleva katsemeetodiga kasutamiseks sobiv liik tänu lühikesele elutsüklile ja võimalusele tuvastada selle geneetilist sugu (2), mida peetakse selle katsemeetodi keskse tähtsusega komponendiks. Meetodis kirjeldatud konkreetsed meetodid ja vaatluste lõppnäitajad on kohaldatavad üksnes jaapani riisikala suhtes. Sarnase katse-eeskirja jaoks võivad sobida ka muud väikesed kalaliigid (nt vöötdaanio).

2. Käesoleva katsemeetodi kohaselt mõõdetakse mitmeid bioloogilisi lõppnäitajaid. Esmajoones pööratakse tähelepanu võimalikule kahjulikule toimele, mis avaldub populatsiooni näitajates, sealhulgas ellujäämus, üldine areng, kasv ja sigimine. Teises järjekorras kogutakse muud kasulikku teavet *vitellogeniini* (*vtg*) mRNA (või vitellogeniini valgu, VTG) ja geneetilise sooga seotud fenotüübi teiseste sootunnuste mõõtmise ning histopatoloogia hindamise teel, et saada andmeid toimemehhanismide kohta ja seostada neid muudes valdkondades ja laboriuuringutes saadud tulemustega juhul, kui leidub *a posteriori* tõendeid kemikaali endokriinfunktsiooni kahjustava potentsiaali kohta (nt muude katsetega on leitud androgeenide või östrogeenide funktsiooni kahjustav toime). Tuleb märkida, et kui kemikaalil või selle metaboliitidel endokriinfunktsiooni kahjustavat toimet ei kahtlustata, võib nimetatud teiseste lõppnäitajate mõõtmise vajadus puududa ning sobivam on kasutada vähem ressursse ja loomi vajavaid uuringuid (1). Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

▼M8

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

3. Kuna uuritud kemikaalide arv on väike ja kõnealuse üsna keeruka katse valideerimisse on kaasatud vähe laboreid, võib eeldada, et katsemeetod vaadatakse läbi ja seda muudetakse saadud kogemuste valguses pärast seda, kui on tehtud piisavalt uuringuid kõnealuse uue uuringukava toimivuse kinnitamiseks. Andmeid saab kasutada endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide analüüsimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku 5. tasemel. Meetodi kohaselt algab katse sellega, et täiskasvanud kalad (põlvkond F0) viiakse sigimisperioodil kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Kokkupuude jätkub põlvkonna ja F1 arengu ja sigimise perioodil kuni põlvkonna F2 koorumiseni. Tänu sellele võimaldab katse hinnata nii struktuurseid kui ka aktiveerivaid radasid, mis mõjutavad endokriinfunktsiooni. Endokriinfunktsiooniga seotud lõppnäitajate tõlgendamisel võib kasutada tõendite kaalukusel põhinevat meetodit.

4. Katsesse tuleks kaasata vajalikul arvul isendeid, et saavutada sigimisega seotud lõppnäitajate hindamiseks piisav statistiline võimsus (vt 3. liide), tagades samal ajal loomade heaolu kaalutlustel, et kasutatavate loomade arv on võimalikult väike. Arvestades kasutatavate katseloomade suurt arvu, tuleb katse vajalikkust hoolikalt kaaluda seoses olemasolevate andmetega, mis võivad juba hõlmata asjakohast teavet paljude MEOGRT lõppnäitajate kohta. Sellega seoses võib abi saada OECD koostatud raamistikust kaladele avalduva mürgisuse katsete kohta (1).

5. Katsemeetod on välja töötatud eelkõige üksiku aine toime eristamiseks. Ent kui tekib vajadus teha katse seguga, siis tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks sobivad tulemused.

6. Enne katse alustamist on oluline koguda andmeid uuritava kemikaali füüsikalis-keemiliste omaduste kohta, eelkõige selleks, et oleks võimalik valmistada püsivaid kemikaalilahuseid. Samuti tuleb kasutada piisavalt tundlikku analüüsimeetodit uuritava kemikaali kontsentratsioonide kontrollimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

7. Katse alustamiseks viiakse suguküpsed isas- ja emasisendid (vähemalt 12 nädalat pärast viljastamist) sigimispaarides kolmeks nädalaks kemikaaliga kokkupuutesse. Selle aja jooksul levitatakse uuritavat kemikaali vanemate põlvkonna (F0) organismis vastavalt kemikaali toksikokineetilistele omadustele. Võimalikult lähedal neljanda nädala esimesele päevale korjatakse mari, et saada põlvkond F1. Põlvkonna F1 kasvatamise ajal (kokku 15 nädalat) hinnatakse kooruvust ja ellujäämust. Lisaks võetakse 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal kaladelt proove arengu lõppnäitajate kindlakstegemiseks ning 12.–14. viljastamisjärgsel nädalal hinnatakse kolme nädala jooksul kudemist. Põlvkond F2 luuakse pärast kolmandat sigivuse hindamise nädalat ja seda kasvatatakse kuni koorumise lõpuni.

KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID

8. Katse nõuetekohasuse suhtes kohaldatakse järgmisi kriteeriume.

— Lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu katse vältel olema ≥ 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist.

— Keskmine veetemperatuur peaks kogu uuringu vältel olema vahemikus 24–26 °C. Üksikutes akvaariumides esinevad põgusad kõrvalekalded keskmisest ei tohiks ületada 2 °C.

▼M8

— Keskmine sigivus iga põlvkonna (F0 ja F1) kontrollrühmades peaks olema suurem kui 20 marjatera paari kohta päevas. Kõikide hindamise jooksul valminud marjaterade viljakus peaks olema üle 80 %. Lisaks peaks kontrollrühma soovituslikust 24 sigimispaarist 16 (> 65 %) väljutama päevas rohkem kui 20 marjatera paari kohta.

— Marjaterade (keskmine) kooruvus kontrollrühmades peaks olema ≥ 80 % (nii põlvkonnas F1 kui ka põlvkonnas F2).

— Kontrollrühmas (F1) peaks (keskmine) ellujäämus kuni 3. viljastamisjärgse nädalani ja alates 3. viljastamisjärgsest nädalast kuni põlvkonnaga F1 katse lõpetamiseni (15. viljastamisjärgne nädal) olema vastavalt ≥ 80 % ja ≥ 90 %.

— Tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsioone lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus ± 20 % mõõtmistulemuste keskväärtusest.

Kuigi see ei ole nõuetekohasuse kriteerium, ei tohiks ühe kontsentratsioonirühma paralleelnõude ega katse kontsentratsioonirühmade vahel olla statistilisi erinevusi vee temperatuuris (igapäevaste temperatuurimõõtmiste põhjal; välja arvatud põgusad kõrvalekalded).

9. Kuigi suurema kokkupuutega rühmades võib täheldada vähenenud sigivust, peaks põlvkonna F0 sigivus kokkupuute suuruse järgi vähemalt kolmandast rühmast alates ja kõigis väiksema kokkupuutega rühmades olema piisav koorumisinkubaatorite täitmiseks. Peale selle peaks põlvkonna F1 embrüote ellujäämus olema kokkupuute suuruse järgi kolmandas rühmas ja kõigis väiksema kokkupuutega rühmades piisav selleks, et hinnata lõppnäitajaid noorkaladest proovide võtmise etapil (vt punktid 36 ja 38 ja 9. liide). Lisaks peaks põlvkonna F1 koorumisjärgne ellujäämus olema kokkupuute suuruse järgi teises rühmas vähemalt nõutaval miinimumtasemel (~ 20 %). Need ei ole otseselt nõuetekohasuse kriteeriumid, vaid soovitused, mis võimaldavad arvutata usaldusväärseid NOEC väärtusi.

10. Kui leitakse kõrvalekaldeid katse nõuetekohasuse kriteeriumidest, tuleks kaaluda selliste kõrvalekallete mõju katsetulemuste usaldusväärsusele ning esitada need kõrvalekalded ja kaalutlused katseprotokollis.

MEETODI KIRJELDUS

Seadmed

11. Tavapärased laboriseadmed, eeskätt järgmised seadmed:

a) hapnikumõõtur ja pH-meeter;

b) seadmed vee kareduse ja leelisuse määramiseks;

c) asjakohased temperatuuri reguleerimise ja soovitatavalt selle pideva jälgimise seadmed;

d) soovitatava biomassisisalduse ja asustustiheduse jaoks piisava suurusega keemiliselt inertsest materjalist proovinõud (vt 3. liide);

e) sobiva täpsusega kaal (st täpsusega ± 0,5 mg).

▼M8

Vesi

12. Katses võib kasutada sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Tagamaks, et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi ega põhjustaks näiteks uuritava kemikaaliga komplekside moodustumist või avaldaks negatiivset mõju sugukarja jõudlusele, tuleks kindlate ajavahemike järel võtta analüüsimiseks veeproove. Kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskemetallide (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (nt Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} ja SO_4^{2-}), pestitsiidide, orgaanilise süsiniku ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks iga kuue kuu järel. Lahjendusvee mõned nõutavad keemilised omadused on esitatud 2. liites. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui ± 0,5 pH-ühikut.

Kokkupuutesüsteem

13. Kokkupuutesüsteemi konstruktsiooni ja selles kasutatavaid materjale ei ole täpsustatud. Katsesüsteemi ehitamiseks tuleks kasutada klaasi, roostevaba terast või muid keemiliselt inertseid materjale, mis ei ole varasemate katsete käigus saastunud. Käesolevas katses kasutamiseks sobiv kokkupuutesüsteem võib koosneda pideva läbivooluga süsteemist (4–13).

Katselahused

14. Uuritava kemikaali põhilahus tuleks viia kokkupuutesüsteemi sobiva pumba abil. Põhilahuse vooluhulka tuleb kalibreerida enne kokkupuute algust põhilahuse kohta tehtava analüüsi tulemuste põhjal ning seda tuleb katse jooksul regulaarselt volumeetriliselt kontrollida. Igas kambris olevat uuritavat lahust värskendatakse piisaval määral (nt vähemalt 5 ja kuni 16 kambri mahu värskendust päevas või voolukiirus kuni 20 ml/min) olenevalt uuritava kemikaali püsivusest ja vee kvaliteedist.

15. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahjendusvees mehaanilisel teel (nt segamine ja/või ultrahelitöötlus) soovitatavalt lihtsalt segada või loksutada. Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne/-süsteeme või passiivse doseerimise meetodeid (14). Lahustite ja kandeainete kasutamist tuleks kõigi vahenditega vältida, sest 1) teatud lahustid võivad ise põhjustada mürgisust ja/või soovimatud või ootamatuid reaktsioone; 2) kemikaalide uurimine nende vees lahustuvusest kõrgemal kontsentratsioonil (nagu lahustite kasutamise puhul sageli juhtub) võib raskendada toimet avaldava kontsentratsiooni täpset kindlakstegemist; 3) lahustite kasutamine pikaajalistes katsetes võib põhjustada mikroobide tegevusega seotud märkimisväärset bioloogilist määrdumist, mis võib mõjutada keskkonnatingimusi ja kokkupuutekontsentratsioonide säilitamise võimet ning 4) kui puuduvad varasemad andmed, mille kohaselt lahusti ei moonuta uuringu tulemust, tuleb lahusti kasutamiseks teha lahustiga kontroll, mis aga mõjutab loomade heaolu, kuna katse jaoks on sel juhul vaja rohkem loomi. Raskesti uuritava kemikaali puhul võib lahustit kasutada viimase võimalusena ning parima meetodi kindlakstegemisel tuleb arvesse võtta OECD juhendit nr 23 raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonna suhtes avalduva mürgisuse uurimise kohta (15). Lahusti valiku määravad uuritava kemikaali keemilised omadused ja olemasolevad varasemad andmed lahusti kasutamise kohta. Lahusti kandeainete kasutamise korral tuleb lisaks ilma lahustita (negatiivsetele) kontrollidele (üksnes lahjendusvesi) hinnata ka sobivaid lahustiga kontrolle. Kui lahusti kasutamine on vältimatu ja tekib mikroobne aktiivsus (bioloogiline määrdumine), on soovitatav iga paagi bioloogiline määrdumine kogu katse jooksul (vähemalt kord nädalas)

▼M8

registreerida/protokollida. Ideaaljuhul peaks lahusti kontsentratsioon olema lahustiga kontrollis ja kõigis katseproovides pidevalt ühtlane. Kui lahusti kontsentratsioon ei ole pidevalt ühtlane, tuleks lahustiga kontrolliks kasutada katseproovide kõige suuremat lahusti kontsentratsiooni. Lahusti kandeaine kasutamise korral ei tohiks lahusti suurim kontsentratsioon ületada 100 µl/l või 100 mg/l (15) ja soovitatavalt tuleks hoida lahusti kontsentratsioon võimalikult madalal (*nt* < 20 µl/l), et vältida lahusti võimalikku mõju mõõdetavatele lõppnäitajatele (16).

Katseloomad

Kalade valimine ja pidamine

16. Katses kasutatav liik on jaapani riisikala *Oryzias latipes*, kuna sellel on lühike elutsükkel ja võimalus teha kindlaks geneetilist sugu. Kuigi sarnase katse-eeskirja jaoks võivad sobida ka muud väikesed kalaliigid, on käesolevas katsemeetodis kirjeldatud konkreetsed katsemeetodid ja vaatluste lõppnäitajad kohaldatavad üksnes jaapani riisikala suhtes (vt punkt 1). Riisikala paljunemist vangistuses on lihtne esile kutsuda; on olemas selle kasvatamist käsitlevad avaldatud meetodid (17–19), samuti andmed lühiajalise letaalsuse, varase elujärgu ja kogu elutsükli katsete kohta (5–6, 8–9, 20). Kõigi kalade puhul kasutatakse valgusrežiimi 16 h valgust ja 8 h pimedust. Kalu söödetakse soolase vee krevettide (*Artemia* spp.) elusate noorjärgus isenditega, millele võib vajadusel lisada kaubanduslikult müüdavat helvessööta. Kaubanduslikult müüdavat helvessööta tuleb korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes.

17. Sobivate kasvatusmeetodite järgimise korral ei ole kohustuslik rakendada konkreetset kasvatuseeskirja. Näiteks võib riisikala kuni 4. viljastamisjärgse nädalani kasvatada 2 l proovinõudes tihedusega 240 kalavastset nõu kohta, seejärel kuni 8. viljastamisjärgse nädalani 2 l nõudes tihedusega 10 kala nõu kohta. Pärast seda paigutatakse kalad sigimispaaridena 2 l nõudesse.

Kalade kohandamine ja valimine

18. Katsealused kalad tuleks valida ühest laboriparvest, mida on vähemalt kahe nädala vältel enne katset kohandatud selliste veekvaliteedi ja valgustustingimustega, mis sarnanevad katses kasutatavatele tingimustele (märkus: nimetatud kohanemisperiood ei asenda kokkupuute-eelset perioodi). Soovitatavalt tuleks katsealused kalad soetada kohalikust kasvandusest, sest täiskasvanud kalade transportimine põhjustab stressi ja võib häirida kudemist. Pidamisperioodil tuleks kalu kaks korda päevas sööta soolase vee krevettidega ning kokkupuute etapil tuleks sellele vajaduse korral lisada kaubanduslikult müüdavat helvessööta. Piisava replitseeritavuse tagamiseks peetakse katse alustamise eeltingimuseks vähemalt 42 sigimispaari olemasolu (54 sigimispaari juhul, kui on vaja kasutada lahustiga kontrolli, kuna puuduvad piisavad varasemad andmed, mis võimaldaksid kasutada ainult lahustita kontrolli). Lisaks tuleb põlvkonna F0 iga sigimispaari puhul kontrollida XX-XY kromosoomide (st kummagi soo sugukromosoomide normaalkomplekti) olemasolu, et vältida spontaansete XX isaste kaasamist (vt punkt 39).

▼M8

19. Kohanemise etapil tuleb registreerida kasvukalade seas esinev suremus ning pärast 48-tunnist rahunemisperioodi kohaldatakse järgmisi kriteeriume.

— Kui suremus kasvupopulatsioonis on seitsme päeva jooksul enne katsesüsteemi üleviimist suurem kui 10 %, jäetakse kogu partii kõrvale.

— Kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul enne katsesüsteemi üleviimist suurem kui 5–10 %, lastakse kaladel veel seitse päeva kohaneda nii, et kohanemisperiood on kokku kaks nädalat. Kui kõnealuse järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, jäetakse kogu partii kõrvale.

— Kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul enne katsesüsteemi üleviimist väiksem kui 5 %, loetakse partii vastuvõetavaks.

20. Katsele eelneva kahenädalase kohanemisperioodi vältel ja kokkupuute ajal ei tohiks kaladel haigusi ravida ning võimaluse korral tuleks haiguste ravi täielikult vältida. Kliiniliste haigustunnustega kalu ei tohiks uuringus kasutada. Katsele eelnenud perioodil tehtud vaatlused ning haiguste ennetamiseks ja raviks kasutatud meetodid tuleks dokumenteerida.

21. Kokkupuuteperioodi tuleks alustada eristatavate sootunnuste ja geneetiliselt kindlaks tehtud sooga täiskasvanud kaladega, kes pärinevad temperatuuril 25 ± 2 °C kasvatatud labori suguküpsete loomade varudest. Kalade sigimisvõime (st varasem eluvõimeliste järglaste saamine) peaks olema kokkupuutele eelneva nädala jooksul kontrollitud. Katses kasutatavas kalade rühmas peaks kõikide kalade kehamass soo järgi jääma katse alguses vahemikku ± 20 % samasooliste kalade massi aritmeetilisest keskmisest. Hinnangulise keskmise kehamassi leidmiseks tuleks enne katset kalu osaliselt kaaluda. Valitud kalad peaksid olema vähemalt 12 nädalat vanad (alates viljastamisest) ning nende kehamass peaks olema emastel ≥ 300 mg ja isastel ≥ 250 mg.

KATSEPLAAN

Katsekontsentratsioonid

22. Soovitatavalt tuleks kasutada kemikaali viit kontsentratsiooni ja kontrolli/kontrolle. Katsekontsentratsioonide vahemiku valimisel tuleks arvesse võtta kõiki teabeallikaid, sealhulgas kvantitatiivseid struktuur-aktiivsussõltuvusi (QSAR), analoogmeetodeid, kaladega tehtud muude katsete, näiteks ägeda mürgisuse katsete (käesoleva lisa peatükk C.1), kalade paljunemise lühiajaliste katsete (käesoleva lisa peatükk C.48) ja muude katsemeetoditega (nt käesoleva lisa peatükid C.15, C.37, C.41, C.47 või C.49; (21–26) saadud tulemusi, kui need on kättesaadavad, ning vajaduse korral ka vahemiku leidmise katsega (mis võib hõlmata sigimisetappi) kogutud andmeid. Vajaduse korral võib vahemiku leidmise katse läbi viia lõpliku katsega sarnastel tingimustel (veekvaliteet, katsesüsteem, loomade biomass). Kui tuleb kasutada lahustit, mille kohta puuduvad varasemad andmed, saab vahemiku leidmise katse abil kontrollida lahusti sobivust. Suurim katsekontsentratsioon ei tohiks ületada vees lahustuvuse taset 10 mg/l või ühte kümnendikku 96h-LC50 väärtusest (27). Vähim kontsentratsioon peaks olema 10–100 korda väiksem kui suurim kontsentratsioon. Lisaks annuse-toime seoste mõõtmisele võimaldab käesolevas katses

▼M8

viie kontsentratsiooni kasutamine kindlaks määrata ka vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) ja toimet mitte avaldava kontsentratsiooni (NOEC), mis on mõnes regulatiivses kavas või jurisdiktsioonis nõutavad riskihindamise jaoks. Üldiselt peaks uuritava kemikaali järjestikuste nominaalsete kontsentratsioonide vahe kordaja olema ≤ 3,2.

Katse- ja kontrollrühmades kasutatavad paralleelnõud

23. Iga katsekontsentratsiooni kohta tuleks kasutada vähemalt kuut paralleelnõud (vt 7. liide). Sigimisetapil (välja arvatud põlvkonna F0 puhul) tuleks paralleelnõude arv viljakuse hindamiseks kahekordistada ning iga paralleelnõu peab sisaldama üksnes ühte sigimispaari (vt punkt 42).

24. Lisaks katsekontsentratsioonidele tuleks kasutada ka lahjendusveega kontrolli ja vajaduse korral lahustiga kontrolli. Piisava statistilise võimsuse tagamiseks tuleks kontrollide puhul kasutada kahekordset paralleelkambrite arvu (st vähemalt 12 paralleelnõud). Sigimisetapil kontrollrühma paralleelnõude arv kahekordistatakse (st vähemalt 24 paralleelnõud, millest igaüks sisaldab üksnes ühte sigimispaari). Pärast sigimist peaksid kontrollrühma paralleelnõud sisaldama kuni 20 embrüot (kala).

KATSE KÄIK

Katse alustamine

25. Katse põlvkonnana F0 kasutatakse suguliselt aktiivseid täiskasvanud kalu, kes valitakse kahe kriteeriumi põhjal: vanus (üldjuhul rohkem kui 12. viljastamisjärgne nädal, aga soovitatavalt mitte rohkem kui 16. viljastamisjärgne nädal) ja kehamass (emastel ≥ 300 mg ja isastel ≥ 250 mg).

26. Nimetatud tingimustele vastavad emase-isase paarid paigutatakse eraldi paralleelnõudesse: katse alguses 12 paralleelnõud kontrollrühmas ja kuus paralleelnõud kemikaaliga töödeldavates rühmades. Proovinõud jaotatakse juhuslikkuse alusel kontsentratsioonirühma (nt T1–T5 ja kontroll) ja paralleelrühma (nt kontrollid A–L ja kontsentratsiooniproovid A–F) ning asetatakse seejärel kokkupuutesüsteemi, kus igas nõus kasutatakse sellele ette nähtud vooluhulka.

Kokkupuutetingimused

27. Katse parameetrite ja tingimuste täielik ülevaade on esitatud 3. liites. Nende nõuete järgimise korral peaksid kontrollrühma kalade lõppnäitajad olema sarnased 4. liites loetletud väärtustele.

28. Katse ajal tuleks iga kontsentratsioonirühma ja kontrollrühma kohta vähemalt ühes katsenõus mõõta lahustunud hapniku sisaldust, pH-d ja temperatuuri. Nimetatud mõõtmisi (v.a temperatuur) tuleks teha kokkupuuteperioodi vältel vähemalt kord nädalas. Keskmine veetemperatuur peaks olema kogu uuringu vältel vahemikus 24–26 °C. Temperatuuri tuleks mõõta kokkupuuteperioodi vältel iga päev. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui ± 0,5 pH-ühikut. Ühe kontsentratsioonirühma paralleelnõude ega katse kontsentratsioonirühmade vahel ei tohiks olla statistilisi erinevusi vee temperatuuris (igapäevaste temperatuurimõõtmiste põhjal; välja arvatud põgusad kõrvalekalded).

▼M8

Kokkupuute kestus

29. Katses viiakse põlvkonna F0 sigimisvõimelised kalad kemikaaliga kokkupuutesse kolmeks nädalaks. Neljandal nädalal (u 24. katsepäeval) moodustatakse põlvkond F1, põlvkonna F0 sigimispaarid surmatakse humaansel viisil ning nende kehamass ja pikkus registreeritakse (vt punkt 34). Seejärel viiakse põlvkond F1 veel 14 nädalaks kemikaaliga kokkupuutesse (põlvkonna F1 kokkupuuteaeg on kokku 15 nädalat) ja põlvkond F2 jääb kokkupuutesse kaheks nädalaks kuni koorumiseni. Katse põhiosa kogukestus on 19 nädalat (st kuni põlvkonna F2 koorumiseni). Katse ajakava on esitatud tabelis 2 ja seda on täpsemalt selgitatud 9. liites.

Söötmisrežiim

30. Kalu võib sööta piiramatus koguses soolase vee krevettide (*Artemia* spp.) 24 tunni vanuste noorjärgus isenditega, millele võib vajadusel lisada kaubanduslikult müüdavat helvessööta. Kaubanduslikult müüdavat helvessööta tuleks regulaarselt analüüsida saasteainete, näiteks kloororgaaniliste pestitsiidide, polütsükliliste aromaatsete süsivesinike ja polüklooritud bifenüülide sisalduse suhtes. Suures koguses endokriinse toimega aineid (nt fütoöstrogeenid) sisaldavat sööta, mis võib katses tekkivat reaktsiooni mõjutada, ei tohiks kasutada. Sööda ülejäägid ja väljaheited tuleks eemaldada katsenõudest vastavalt vajadusele, näiteks iga nõu põhja ettevaatliku puhastamisega sifooni abil. Üks või kaks korda nädalas tuleks puhastada ka iga nõu külgi ja põhja (nt spaatliga kaapimise teel). Üks söötmisgraafiku näide on esitatud 5. liites. Söödaratsioon sõltub kalade arvust paralleelnõus. Seetõttu vähendatakse söödaratsiooni juhul, kui paralleelnõus esineb kalade suremust.

Analüüsid ja mõõtmised

31. Enne kokkupuuteperioodi algust tuleks tagada kemikaali lisamise süsteemi nõuetekohane toimimine. Tuleks kindlaks teha kõik vajalikud analüüsimeetodid, sealhulgas peaks olema piisavalt teavet uuritava kemikaali püsivuse kohta katsesüsteemis. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid sobivate ajavahemike järel, soovitavalt vähemalt igal nädalal iga kontsentratsioonirühma ühes paralleelnõus, jälgides, et eri nädalatel kasutataks samas kontsentratsioonirühmas erinevaid paralleelnõusid.

32. Katse ajal tuleks ettenähtud ajavahemike järel (nt vähemalt kolm korda nädalas) kontrollida lahjendusvedeliku ja põhilahuse vooluhulka. Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Ent kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud kogu katse jooksul säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % keskmisest mõõdetud väärtusest, võivad tulemused põhineda kas nominaalsetel või mõõdetud väärtustel. Olulisel määral kaladesse kogunevate uuritavate kemikaalide puhul võivad katsekontsentratsioonid kalade kasvades väheneda. Sellisel juhul soovitatakse kohandada iga kambri katselahuse värskendamise sagedust, et hoida katsekontsentratsioone võimalikult ühtlasena.

Vaatlused ja mõõdetavad lõppnäitajad

33. Populatsiooni tasemel ilmneva võimaliku toime hindamiseks mõõdetavad lõppnäitajad on sigivus, viljakus, koorumine, kasv ja ellujäämus. Lisaks tuleks iga päev vaadelda kalade käitumist ja registreerida ebatavaline käitumine. Muud mehhanistlikud lõppnäitajad on maksa vitellogeniini (*vtg*) mRNA või vitellogeniini valgu (VTG) tase, mis määratakse immuunanalüüsiga (28), fenotüübilised soomarkerid (nt isaskaladele iseloomulikud pärakuuime papillaarjätked), sugunäärmete koeanalüüsi põhjal määratud sugu ning neerude, maksa ja sugunäärmete histopatoloogiline hindamine (vt tabelis 1 esitatud lõppnäitajate loendit). Kõikide nimetatud konkreetsete lõppnäitajate hindamisel lähtutakse isendi geneetilise soo kindlakstegemisest riisikala isassugu määrava geeni *dmy* esinemise või puudumise põhjal (vt punkt 41). Lisaks hinnatakse kudemise aega. Peale selle võib pärakuuime papillaarjätkete loendamise teel kogutud andmete põhjal kindlaks teha lihtsa fenotüüpse soolise jagunemise, et

▼M8

liigitada riisikala isendid fenotüübi järgi isaseks või emaseks. Käesoleva katsemeetodi puhul ei eeldata, et sellega on võimalik tuvastada mõõdukaid kõrvalekaldeid eeldatavast soolisest jagunemisest, kuna kalade suhteliselt väike arv proovi kohta ei taga piisavat statistilist võimsust. Pelegi uuritakse histopatoloogilise hindamise käigus sugunääret ja viiakse läbi palju põhjalikumad analüüsid sugunäärme fenotüübi hindamiseks geneetilise soo kontekstis.

34. Käesoleva katsemeetodi peamine eesmärk on hinnata uuritava kemikaali võimalikku toimet populatsioonile. Lisaks aitavad mehhanistlikud lõppnäitajad (vitellogeniin, teisesed sootunnused ja mõned sugunäärmete histopatoloogiaga seotud toimed) kindlaks teha, kas mõni toime avaldub endokriinfunktsiooni vahendusel. Samas võivad kõnealuseid mehhanistlikke lõppnäitajaid mõjutada ka süsteemsed või muud mürgised toimed. Seetõttu võidakse üksikasjalikult hinnata ka maksa ja neerude histopatoloogiat, et mehhanistlikes lõppnäitajates avalduvaid reaktsioone paremini mõista. Ent juhul, kui nimetatud üksikasjalikke hindamisi ei tehta, tuleks siiski tähele panna ja aruannetes kajastada histopatoloogilise hindamise käigus juhuslikult avastatud suuri kõrvalekaldeid.

Kalade humaanne surmamine

35. Põlvkondade F0 ja F1 kokkupuute lõpetamisel ning noorkalade osaproovide võtmisel tuleks kalad surmata vajaliku koguse anesteetikumilahusega (nt trikaiinmetaansulfonaat, MS-222, CASi nr 886-86-2, kontsentratsiooniga 100–500 mg/l), mis on limaskesta ärrituse vähendamiseks puhverdatud $NaHCO_3$-ga (naatriumvesinikkarbonaat, CASi nr 144-55-8) kontsentratsioonis 300 mg/l. Kui kaladel ilmneb märkimisväärsete kannatuste tunnuseid (mis on väga raskekujulised ja kalade surm on usaldusväärselt prognoositav) ja nad on surmaeelses seisundis, tuleks nad tuimastada ja surmata ning arvestada nende andmetega suremuse analüüsimisel. Haigestunud kalade surmamise juhud tuleb üles märkida ja neid aruannetes kajastada. Olenevalt sellest, millisel uuringu etapil kalad surmatakse, võidakse kalu säilitada histopatoloogiliseks analüüsiks (kalade fikseerimine võimalikuks histopatoloogia uuringuks).

Marja ja kalavastsete käitlemine

Sigimispaaride marjaterade kogumine järgmise põlvkonna paljundamiseks

36. Põlvkondade F0 ja F1 vahel kogutakse marja 4. katsenädala esimesel päeval (või vajadusel esimesel kahel päeval) ning põlvkondade F1 ja F2 vahel 18. katsenädala esimesel päeval. Põlvkond F1 on 18. katsenädalaks täiskasvanud ja elanud viljastamisest alates 15 nädalat. Kõik marjaterad tuleb eemaldada nõust üks päev enne nende kogumist tagamaks, et kõik sigimispaarilt kogutud marjaterad pärinevad samast kudust. Mõnikord kannavad emased riisikalad oma marjaterasid pärast kudemist pärakuava juures, et paigutada need substraadile. Kuna nõus substraati ei ole, võib marjaterad leida emase kala küljest või nõu põhjast. Olenevalt asukohast eemaldatakse marjaterad ettevaatlikult emase kala küljest või kogutakse põhjast sifooniga 4. katsenädalal (põlvkond F0) või 18. katsenädalal (F1). Kõigist samast kontsentratsioonirühmast kogutud marjateradest moodustatakse enne inkubatsioonikambritesse paigutamist üks koondkogum.

▼M8

37. Marjaterasid koos hoidvad kuduniidid eemaldatakse. Igalt sigimispaarilt (üks paar paralleelnõu kohta) kogutakse viljastatud marjaterad (kuni 20), millest moodustatakse kontsentratsioonirühmade lõikes koondkogumid, mis jaotatakse süstemaatiliselt sobivatesse inkubatsioonikambritesse (6. ja 7. liide). Kvaliteetse stereomikroskoobi all on võimalik näha esimesi viljastamise/arengu tunnuseid, näiteks kõldkesta (koorioni) kerkimist, rakkude jagunemist või blastula kujunemist. Inkubatsioonikambrid võib paigutada iga kontsentratsioonirühma jaoks valmis pandud eraldi inkubatsiooniakvaariumidesse (sel juhul tuleb nendes mõõta veekvaliteedi näitajaid ja uuritava kemikaali kontsentratsioone) või paralleelakvaariumisse, mis hakkab sisaldama koorunud vastseid (*nt* eelvastseid). Kui vaja on ka teist kogumispäeva (katse 23. päev), tuleb mõlemal päeval kogutud marjateradest moodustada koondkogum, mis jaotatakse seejärel süstemaatiliselt kontsentratsioonirühma paralleelnõudesse.

Marjaterade kasvatamine koorumiseni

38. Viljastatud marjaterasid loksutatakse näiteks marjainkubaatoris pidevalt õhumullide abil või marjainkubaatori üles-alla liigutamise teel. Viljastatud marjaterade (embrüote) suremust kontrollitakse ja registreeritakse iga päev. Surnud marjaterad eemaldatakse inkubaatoritest (9. liide). Seitsmendal viljastamisjärgsel päeval loksutamine lõpetatakse või seda vähendatakse, et viljastatud marjaterad sadestuksid inkubaatori põhja. See soodustab koorumist, mis tavaliselt toimub järgmise ühe kuni kahe päeva jooksul. Igas menetlus- ja kontrollrühmas loendatakse (paralleelnõude lõikes koondatult) vastkoorunud isendid (noored vastsed; eelvastsed). Viljastatud marjaterad, mis ei ole koorunud kontrollrühma koorumispäeva mediaaniga võrreldes kaks korda pikema aja jooksul (tavaliselt 16 või 18 päeva pärast viljastamist), tunnistatakse eluvõimetuks ja jäetakse kõrvale.

39. Igasse paralleelnõusse pannakse 12 vastkoorunud isendit. Inkubatsioonikambritest kogutud vastkoorunud isenditest moodustatakse koondkogum, mis jaotatakse süstemaatiliselt paralleelnõudesse (7. liide). Selleks võib valida kontsentratsioonirühmast juhuslikult ühe vastkoorunud isendi ning lisada selle üksteise järel juhuslikult valitud paralleelakvaariumisse. Iga nõu peaks sisaldama võrdsel arvul (n = 12) koorunud vastseid (mitte rohkem kui 20 vastset nõu kohta). Kui vastsete arv ei ole kontsentratsiooni rühma kõikide paralleelnõude täitmiseks piisav, soovitatakse moodustada võimalikult palju 12 vastsega paralleelnõusid. Vastsete ohutuks käitlemiseks saab kasutada suure avaga klaaspipetti. Kõik üle jäävad vastsed surmatakse humaanselt anesteetikumi abil. Mõne nädala jooksul enne sigimispaaride ettevalmistamist tuleks iga paralleelnõu puhul registreerida esimese kudemissündmuse päev.

Sigimispaaride ettevalmistamine

Uimede lõikamine ja genotüübilise soo kindlakstegemine

40. Genotüübiline sugu tehakse uimest lõigatud tükkide abil kindlaks 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal (st põlvkonna F1 puhul 12.–13. katsenädalal). Kõik nõus olevad kalad tuimastatakse (kasutades heakskiidetud meetodit, nt IACUC) ning iga kala sabauime selja- või kõhupoolsest otsast võetakse väike koeproov, et teha kindlaks isendi genotüübiline sugu (29). Paralleelrühma kalu võib hoida paralleelnõus väikestes puurides (võimaluse korral üks kala puuri kohta). Teise variandina võib igas puuris hoida kahte kala, kui need on üksteisest eristatavad. Üks eristamise meetod on teha koeproovi võtmisel sabauime erinevad lõiked (*nt* ühel kalal seljapoolsest ja teisel kõhupoolsest otsast).

▼M8

41. Riisikala genotüübiline sugu määratakse Y-kromosoomis asuva tuvastatud järjestusega geeni (*dmy*) põhjal. *Dmy* olemasolu näitab, et tegemist on XY-isendiga, olenemata kala fenotüübist, samas kui *dmy* puudumine osutab XX-isendile, olenemata fenotüübist (30, 31). Igast uimetükist eraldatakse desoksüribonukleiinhape (DNA) ja *dmy* olemasolu või puudumise kindlakstegemiseks saab kasutada polümeraasi ahelereaktsiooni (PCR) meetodeid (vt käesoleva lisa peatüki C.419. liide või (29) 3. ja 4. liide).

Sigimispaaride moodustamine

42. Genotüübilise soo andmete põhjal moodustatakse XX-XY sigimispaarid, olenemata välisest fenotüübist, mis võib uuritava kemikaaliga kokku puutudes muutuda. Iga kala genotüübilise soo kindlakstegemisele järgneval päeval valitakse igast paralleelnõust juhuslikult kaks XX-kala ja kaks XY-kala ning neist moodustatakse kaks XX-XY sigimispaari. Kui paralleelnõu ei sisalda kahte XX- või XY-kala, tuleb vastavad kalad võtta sama kontsentratsioonirühma teistest paralleelnõudest. Eesmärk on saada soovitatud arvul paralleelseid sigimispaare nii igasse kontsentratsioonirühma (12 paari) kui ka kontrollrühma (24 paari). Sigimispaaride moodustamisel tuleks välistada ilmsete kõrvalekalletega kalad (probleemid ujupõiega, deformeerunud selgroog, äärmuslikult suur või väike kasv jne). Põlvkonna F1 sigimisetapil peaks iga paralleelnõu sisaldama üksnes ühte sigimispaari.

Noorkalade proovide võtmine ja lõppnäitajate hindamine

Sigimispaaridesse mittekuuluvate kalade proovide võtmine

43. Pärast sigimispaaride moodustamist surmatakse valimata jäänud kalad humaanselt 12.–13. katsenädalal (põlvkond F1), et mõõta noorkalade lõppnäitajaid. Äärmiselt oluline on käidelda kalu nii, et säiliks sigimispaaride valimise eesmärgil kindlaks tehtud genotüübilise soo tuvastamise võimalus. Kõigi kogutud andmeid analüüsitakse konkreetse kala genotüübilisest soost lähtudes. Iga kala kasutatakse erinevates lõppnäitajate mõõtmistes, mis hõlmavad järgmist: noorkalade ellujäämismäärad (7.–12./13. katsenädal, põlvkond F1), pikkuse (kui sabauime on geneetilise soo analüüsiks kasutatud proovide võtmise tõttu lühendatud, võib mõõta standardpikkust; kui *dmy* määramiseks onsabauime selja või kõhu poolt üksnes osaliselt kärbitud, võib mõõta üldpikkust) ja kehamassi (st märgmass, kuivatuspaberiga kuivatatult) juurdekasv, maksa *vtg* mRNA (või VTG) ja pärakuuime papillaarjätked (vt tabelid 1 ja 2). Pange tähele, et kontsentratsioonirühma keskmise juurdekasvu arvutamiseks tuleb mõõta ka sigimispaaride massid ja pikkused.

Koeproovide võtmine ja vitellogeniinisisalduse mõõtmine

44. Maks eraldatakse ning säilitatakse temperatuuril ≤ –70 °C kuni *vtg* mRNA (või VTG) mõõtmiseni. Kala saba koos pärakuuimega konserveeritakse sobivas (nt Davidsoni) fiksaatoris või pildistatakse nii, et hiljem oleks võimalik loendada pärakuuime papillaarjätkeid. Soovi korral võib sellel etapil konserveerimiseks proove võtta ka muudest kudedest (nt sugunäärmed). Maksa VTG kontsentratsioon tuleks määrata homoloogse ELISA meetodiga (riisikala puhul soovitatav menetlus on esitatud käesoleva lisa peatüki C.486. liites). Teise variandina on USA Keskkonnakaitseamet kirjeldanud vtg mRNA kvantitatiivse määramise meetodeid: *vtg I* geeni mRNA

▼M8

eraldamine maksaproovist ja *vtg I* geeni koopiate loendamine (ühe nanogrammi mRNA üldkoguse kohta) kvantitatiivse PCR-meetodiga (29). Selle asemel, et loendada *vtg* geeni koopiaid nii kontrollrühmas kui ka kontsentratsioonirühmades, võib vähem ressursinõudliku ja tehniliselt lihtsama meetodina uurida *vtg I* ekspressiooni suhtelist muutust kontrollrühma ja kontsentratsioonirühmade võrdluses.

Teisesed sootunnused

45. Tavaoludes on ainult suguküpsetel isastel riisikaladel papillaarjätked, mis kasvavad teiseste sootunnustena mõnedele pärakuuime kiirelülidele ning mida saab kasutada endokriinfunktsiooni kahjustava toime biomarkerina. Pärakuuime papillaarjätkete (papillaarjätketega kiirelülide) loendamise meetod on esitatud 8. liites. Isendi pärakuuime papillaarjätkete arvu kasutatakse ka selleks, et liigitada isendid välise fenotüübi järgi isaseks või emaseks ning arvutada selle põhjal sooline jaotumine igas paralleelnõus. Rohkem kui 0 papillaarjätkega riisikala liigitatakse isaseks; 0 papillaarjätkega riisikala liigitatakse emaseks.

Sigivuse ja viljakuse hindamine

46. Sigivust ja viljakust hinnatakse põlvkonna F0 puhul 1.–3. katsenädalal ning põlvkonna F1 puhul 15.–17. katsenädalal. Igalt sigimispaarilt kogutakse 21 järjestikusel päeval marjaterasid. Igal hommikul eemaldatakse marjaterad ettevaatlikult võrku püütud emaste küljest ja/või kogutakse sifooni abil akvaariumi põhjast. Iga päev registreeritakse kõigi paralleelsete sigimispaaride sigivuse ja viljakuse näitajad. Sigivuse näitajana käsitatakse koetud marjaterade arvu ning viljakust mõõdetakse loendamise hetkeks viljastatud ja eluvõimeliste marjaterade arvu põhjal. Marjaterad tuleks loendada võimalikult kiiresti pärast kogumist.

47. Sigivuse registreerimiseks märgitakse iga päev üles iga paralleelse sigimispaari marjaterade arv, mida analüüsitakse soovitatud statistiliste meetoditega, kasutades paralleelnõude keskmisi väärtusi. Sigimispaari viljakuse näitaja on sellelt paarilt pärit viljastatud marjaterade arv, mis on jagatud sellelt paarilt pärit marjaterade koguarvuga. Statistiliselt analüüsitakse viljakust suhtarvuna iga paralleelnõu kohta. Kooruvuse näitaja on vastkoorunud isendite arv, mis on jagatud paralleelnõusse pandud embrüote arvuga (tavaliselt 20). Statistiliselt analüüsitakse kooruvust suhtarvuna iga paralleelnõu kohta.

Täiskasvanud kalade proovide võtmine ja lõppnäitajate hindamine

Sigimispaaridesse kuuluvate kalade proovide võtmine

48. Pärast 17. katsenädalat (st pärast põlvkonna F2 edukat sigitamist) surmatakse põlvkonna F1 täiskasvanud kalad humaansel viisil ja hinnatakse nende erinevaid lõppnäitajaid (vt tabelid 1 ja 2). Pärakuuime papillaarjätkete loendamiseks (vt 8. liide) tehakse pärakuuimedest pildid ja/või eemaldatakse saba vahetult pärakuava tagant tehtava lõikega ning fikseeritakse see hilisemaks papillaarjätkete loendamiseks. Soovi korral võib sellel etapil võtta arhiveerimiseks proovi sabauimest, mis võimaldab kontrollida geneetilist sugu (*dmy*). Vajadusel võib võtta koeproovi, et kontrollida konkreetsete kalade sugu korduva *dmy* analüüsi abil. Enne kogu keha sobivasse (nt Davidsoni) fiksaatorisse asetamist avatakse kehaõõnsus, et võimaldada selle perfusiooni fiksaatoriga. Ent kui enne fikseerimist kasutatakse sobivat fiksaatori sissepääsu soodustavat meetodit, siis ei ole vaja kehaõõnsust avada.

▼M8

Histopatoloogiline analüüs

49. Iga kala analüüsitakse histoloogiliselt, et leida võimalikke patoloogiaid sugunäärmete koes (30, 29). Nagu on osutatud punktis 33, võivad süsteemsed või muud mürgised toimed mõjutada käesoleva katsemeetodiga hinnatavaid muid mehhanistlikke lõppnäitajad (VTG, teisesed sootunnused ja mõned sugunäärmete histopatoloogiaga seotud toimed). Seetõttu võidakse üksikasjalikult hinnata ka maksa ja neerude histopatoloogiat, et mehhanistlikes lõppnäitajates avalduvaid reaktsioone paremini mõista. Ent juhul, kui nimetatud üksikasjalikke hindamisi ei tehta, tuleks siiski tähele panna ja aruannetes kajastada histopatoloogilise hindamise käigus juhuslikult avastatud suuri kõrvalekaldeid. Kaaluda võib meetodit, mille puhul alustatakse analüüsi suurima kemikaalikontsentratsiooniga rühmast (võrreldes kontrollrühmaga) ja jätkatakse allapoole liikudes kontsentratsioonirühmani, kus toimet ei avaldu, kuid soovitatav on tutvuda asjakohaste histopatoloogia juhenditega (29). Üldjuhul töödeldakse kõiki proove / tehakse proovidest lõiked, mida patoloog seejärel analüüsib. Seoses allapoole liikumise meetodi kasutamisega tuleb märkida, et Rao-Scotti kohandusega Cochrane'i-Armitage'i lõiktestis (RSCABS) lähtutakse eeldusest, et dooside kasvades suureneb ka bioloogiline toime (patoloogia). Seetõttu on järelduste statistiline võimsus väiksem, kui vaadeldakse üksnes ühte suurt doosi ilma vahepealsete doosideta. Selline meetodi võib olla vastuvõetav juhul, kui suure doosi toime puudumises veendumiseks ei ole vaja teha statistilist analüüsi. Kõnealuse hindamise käigus selgitatakse välja ka sugunäärme fenotüüp.

Muud tähelepanekud

50. MEOGRTga saadavate andmete abil saab samaaegselt hinnata (nt tõendite kaalukuse meetodiga) vähemalt kahte liiki kahjuliku toime radasid, mis viivad sigimisvõime häireni: a) endokriinse toime rajad, mille puhul esinevad endokriinfunktsiooni häired hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) teljel, ja b) muu kui endokriinse mürgisuse kaudu ellujäämust, kasvamist (pikkuses ja massis) ja sigimist pärssivad rajad. Käesolev katse hõlmab ka tavaliselt kroonilise mürgisuse katsetes (nt kogu elutsükli ja varase elujärgu katsed) mõõdetavaid lõppnäitajaid, mille abil saab hinnata nii endokriinse mürgisuse radasid kui ka muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduvat mürgisust. Katse ajal tuleks iga päev vaadelda kalade käitumist ja registreerida ebatavaline käitumine. Lisaks tuleks registreerida suremuse näitajad ja arvutada kalade ellujäämus kuni väljapraakimise etapini (6./7. katsenädal), väljapraakimisest kuni noorkalade proovide võtmiseni (9.–10. viljastamisjärgne nädal) ning paaride moodustamisest kuni täiskasvanud kalade proovide võtmiseni.

Tabel 1

Ülevaade MEOGRT lõppnäitajatest (*)

Arengujärk	Lõppnäitaja	Põlvkond
Embrüo (2. viljastamisjärgne nädal)	Koorumine (% ja koorumiseni kulunud aeg)	F1, F2
Maim (4. viljastamisjärgne nädal)	Ellujäämus	F1
Noorkala (9. või 10. viljastamisjärgne nädal)	Ellujäämus	F1
	Kasv (pikkus ja mass)	

▼M8

Arengujärk	Lõppnäitaja	Põlvkond
	Vitellogeniin (mRNA või valk)	
	Teisesed sootunnused (pärakuuime papillaarjätked)	
	Sooline jaotumine välistunnuste järgi	
	1. kudemiseni kulunud aeg	
Täiskasvanu (12.-14. viljastamisjärgne nädal)	Paljunemine (sigivus ja viljakus)	F0, F1
Täiskasvanu (15. viljastamisjärgne nädal)	Ellujäämus	F1
	Kasv (pikkus ja mass)	
	Teisesed sootunnused (pärakuuime papillaarjätked)	
	Histopatoloogiline analüüs (sugunääre, maks, neerud)	

(*) Neid lõppnäitajaid tuleb statistiliselt analüüsida.

AJAKAVA

51. MEOGRT näitlik ajakava on esitatud tabelis 2. MEOGRT hõlmab 4-nädalast põlvkonna F0 täiskasvanud isendite ja 15-nädalast põlvkonna F1 kokkupuudet ning teise põlvkonna (F2) kokkupuuteperioodi, mis kestab kuni koorumiseni (2. viljastamisjärgne nädal). Kokkuvõte MEOGRT käigus läbi viidavatest tegevustest on esitatud 9. liites.

Tabel 2

MEOGRT kokkupuute ja mõõtmise lõppnäitajate ajakava

MEOGRT kokkupuute ja lõppnäitajate ajakava

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Katsenädal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Arengujärk					**Embrüo**					**Vastne**					**Maim**			**Noorkala**	**Täiskasvanu**
Lõppnäitajad																			
Sigivus	F_0														F_1				
Viljakus	F_0														F_1				
Koorumine					F_1														F_2
Ellujäämus						F_1						F_1						F_1	
Kasv				F_0								F_1						F_1	
Vitellogeniin												F_1							
Teisesed sootunnused												F_1						F_1	
Histopatoloogiline analüüs																		F_1	
Katsenädal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Katseplaan hõlmab 7 paralleelrühma:
  - 5 rühma, mida mõjutatakse uuritava kemikaaliga;
  - 2 kontrollrühma (lahusti kasutamise korral 4).
- Rühmade koosseis:
  - 12 paralleelnõud sigivuse, täiskasvanu isendite patoloogia ja SSC uurimiseks (10.–18. nädalat);
  - 6 paralleelnõud koorumise, ellujäämuse, vtg ning noorkalade SSC ja kasvu uurimiseks (1.–9. nädal)

SSC – teisesed sootunnused; näd – nädalat;
vtg – vitellogeniin

▼M8

ANDMED JA ARUANDLUS

Statistiline analüüs

52. Kuna genotüübiline sugu tehakse kindlaks kõikide katsealuste kalade puhul, tuleks andmeid analüüsida mõlema genotüübilise soo (XY-isased ja XX-emased) kohta eraldi. Selle tegemata jätmine vähendab oluliselt mis tahes analüüsi statistilist võimsust. Andmete statistiline analüüs peaks eelistatavalt toimuma vastavalt meetoditele, mida on kirjeldatud OECD koostatud juhendis ökotoksilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsete meetodite rakendamise kohta (32). Täiendavaid juhiseid statistilise analüüsi tegemiseks on esitatud 10. liites.

53. Katseplaan ja valitud statistilised testid peaksid tagama piisava statistilise võimsuse, et tuvastada bioloogiliselt olulisi lõppnäitajate muutusi katses, mille puhul tuleb esitada täheldatava toime puudumise kontsentratsioon (NOEC) (32). Konkreetsetest toime avaldumise kontsentratsioonidest aru andmine võib sõltuda asjaomasest õigusraamistikust. Kindlaks tuleks teha iga olulise tuvastatava või hinnatava lõppnäitaja protsentuaalne muutus. Katseplaani tuleks sellest lähtuvalt kohandada. On vähetõenäoline, et kõikide lõppnäitajate puhul täheldatakse sama protsentuaalset muutust ning et on võimalik koostada selline katseplaan, kus kõnealused kriteeriumid on täidetud kõikide lõppnäitajate puhul; seepärast on tähtis keskenduda nõuetekohase katse kavandamisel lõppnäitajatele, mis on asjaomase katse puhul olulised. Andmete töötlemise ja sobivaima statistilise testi või mudeli valimise lihtsustamiseks on 10. liites esitatud statistiline vooskeem ja juhised. Võib kasutada ka muid statistilisi meetodeid, kui need on teaduslikult põhjendatud.

54. Igas paralleelide rühmas on vaja analüüsida varieeruvust dispersioonanalüüsi või sagedustabeli abil ning kasutada selle analüüsi alusel valitud piisavaid ja asjakohaseid statistilisi analüüsimeetodeid. Igal eraldi kontsentratsioonil ja kontrollrühmas saadud tulemuste mitmeseks võrdlemiseks soovitatakse pideva tunnuse puhul kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega meetodit (nt Jonckheere'i-Terpstra testi). Kui andmete puhul ei täheldata monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust, tuleks kasutada Dunnetti või Dunni testi (pärast andmete sobivat teisendamist, kui see on vajalik).

55. Sigivuse puhul tuleks marjaterasid loendada iga päev, kuid analüüsis võib kasutada marjaterade koguarvu või kordusmõõtmise näitajaid. Kõnealuse lõppnäitaja analüüsimist on täpsemalt selgitatud 10. liites. Raskusastme kujul esitatavate histopatoloogia andmete jaoks on välja töötatud uus statistiline test: Rao-Scotti kohandusega Cochrane'i-Armitage'i lõiktest (RSCABS) (33).

56. Protokollis tuleks kajastada kõik kemikaaliga kontsentratsioonirühmades ilmnenud lõppnäitajad, mis erinevad oluliselt vastavatest kontrollrühma väärtustest.

Andmete analüüsiga seotud kaalutlused

Ebaõnnestunud kokkupuutetasemekatsete andmete kasutamine

57. Kui otsustatakse, et kas ühe paralleelrühma või terve kokkupuutetaseme puhul võib avalduda selge mürgisus ja see tuleks analüüsist kõrvale jätta, tuleb arvestada mitut tegurit. Määratluse kohaselt esineb selge mürgisus juhul, kui 3. ja 9. viljastamisjärgse nädala vahel mis tahes paralleelrühmas esinenud surmajuhtumite arv on > 4 ja see ei saa olla tingitud tehnilisest veast. Muud selge mürgisuse nähud on järgmised: veritsemine, ebatavaline

▼M8

käitumine, ebatavaline ujumisviis, isutus ja muud kliinilised haigustunnused. Subletaalse mürgisuse puhul võib olla vajalik kvalitatiivne hindamine; selle tegemisel peaks alati olema aluseks võrdlus lahjendusveega (üksnes puhas vesi) kontrollrühmaga. Kui suurima kontsentratsiooniga rühma(de)s esineb selge mürgisus, soovitatakse need rühmad analüüsist välja jätta.

Lahustiga kontrollid

58. Lahusti kasutamist tuleks kaaluda üksnes viimase abinõuna, kui kõik muud kemikaali lisamise võimalused on läbi vaadatud. Kui kasutatakse lahustit, tuleb samal ajal teha kontrollkatse lahjendusveega. Katse lõpetamisel tuleb hinnata lahusti võimalikku mõju. Seda tehakse lahustiga kontrollrühma ja lahjendusveega kontrollrühma statistilise võrdlemisega. Kõige asjakohasemad lõppnäitajad, mida tuleks kõnealuses analüüsis arvesse võtta, on kasvuga (massiga) seotud tegurid, kuna neid võib mõjutada üldine mürgisus. Kui nende lõppnäitajate puhul tuvastatakse lahjendusveega kontrollrühma ja lahustiga kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi, tuleb parimatest erialateadmistest lähtudes hinnata, kas see ohustab katse nõuetekohasust. Kui kahe kontrollrühma näitajad erinevad, tuleks kemikaaliga kokku puutunud rühmi võrrelda lahustiga kontrollrühmaga, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust lahjendusveega kontrollrühmaga. Kui kahe kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei ole, soovitatakse võrrelda uuritava kemikaaliga kokku puutunud rühmi mõlema kontrollrühma (lahustiga ja lahjendusveega) ühendatud näitajatega, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust ainult lahjendusveega või ainult lahustiga kontrollrühmaga.

Katseprotokoll

59. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed;

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest andmetest.

Katsealune liik:

— teaduslik nimetus, liin (kui on), päritolu ning viljastatud marjaterade kogumise ja järgneva käitlemise meetod.

Katsetingimused:

— valgusrežiim(id);

— katseplaan (nt kambrite suurus, materjal ja veesisaldus, katsekambrite ja paralleelrühmade arv, vastkoorunud isendite arv paralleelnõu kohta);

▼**M8**

— põhilahuste valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada selle nimetus ja kontsentratsioon);

— uuritava kemikaali annustamismeetod (nt pump, lahjendussüsteem);

— meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja nominaalsed katsekontsentratsioonid, määramispiir, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja standardhälbed ja nende arvutamise meetod ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali sisaldust tõelises lahuses;

— lahjendusvee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, kloorijääkide sisaldus (kui on mõõdetud), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (kui on mõõdetud), hõljuvaine sisaldus (kui on mõõdetud), katselahuse soolsus (kui on mõõdetud) ja kõik muud mõõdetud näitajad;

— nominaalsed katsekontsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed;

— vee kvaliteet katsenõudes: pH, temperatuur (iga päev) ja lahustunud hapniku sisaldus;

— üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus).

Tulemused:

— tõendid selle kohta, üldised nõuetekohasuse kriteeriumid on kontrollrühmades täidetud;

— järgmised andmed kontrollrühma (ja selle kasutamise korral lahustiga kontrollrühma) ja kontsentratsioonirühmade kohta: koorumine (kooruvus ja koorumiseni kulunud aeg) põlvkondades F1 ja F2, koorumisjärgne ellujäämus põlvkonnas F1, kasv (pikkus ja kehamass) põlvkonnas F1, genotüübiline sugu ja sooline eristumine (nt pärakuuime papillaarjätkete ja sugunäärme histoloogia põhjal kindlaks tehtud teisesed sootunnused) põlvkonnas F1, fenotüübiline sugu põlvkonnas F1, teisesed sootunnused (pärakuuime papilaarjätked) põlvkonnas F1, *vtg* mRNA (või VTG valk) põlvkonnas F1, põlvkonna F1 histopatoloogiline analüüs (sugunääre, maks ja neerud) ning põlvkondade F0 ja F1 paljunemise näitajad (sigivus ja viljakus); (vt tabelid 1 ja 2);

— statistilise analüüsi puhul kasutatud meetod (regressioonanalüüs või dispersioonanalüüs) ja andmetöötlusviis (kasutatud statistilised testid ja mudelid);

— täheldatava toime puudumise kontsentratsioon (NOEC) iga hinnatud näitaja puhul;

— vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon (LOEC) iga hinnatud näitaja puhul (tasemel p = 0,05); vajaduse korral EC_x iga hinnatud näitaja puhul koos usaldusvahemikuga (nt usaldusnivool 90 % või 95 %) ja graafik selle arvutamiseks kasutatud lähendatud kõveraga, kontsentratsioonist sõltuvuse kõvera tõus, regressioonimudeli võrrand ning mudeli hinnangulised parameetrid ja nende standardviga;

— kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja nõuetekohasuse kriteeriumidest ning nende võimalik mõju katse tulemustele.

▼M8

60. Lõppnäitajate mõõtmistulemuste puhul tuleb esitada keskväärtused ja nende standardhälbed (võimaluse korral nii paralleelrühmade kui ka kontsentratsioonide lõikes).

KIRJANDUS

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(2) Padilla, S., Cowden, J., Hinton, D.E., Yuen, B., Law, S., Kullman, S.W., Johnson, R., Hardman, R.C., Flynn, K. ja Au, D.W.T. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1–36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(4) Benoit, D.A., Mattson, V.R. ja Olson, D.L. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Nakazono, A., Honjo, T. ja Kobayashi, K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925–1930.

(6) Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T. ja Kobayashi, K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552–2560.

(7) Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H. ja Honjo, T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H. ja Kobayashi, K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692–1698.

(9) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H. ja Kobayashi, K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487–1496.

(10) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M. ja Tatarazako, N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288–295.

(11) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M. ja Tatarazako, N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78–86.

(12) Nakamaura, A., Tamura, I., Takanobu, H., Yamamuro, M., Iguchi, T. ja Tatarazako, N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes)*. Journal of Applied Toxicology 35:11–23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Kättesaadav aadressil http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P. ja McLachlan, M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593–599.

▼**M8**

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Majanduskoostöö ja Arengu organisatsioon, Pariis.

(16) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J. ja Pickford, D.B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny, J.S., Spehar, R.L., Mead, K.E. ja Yousuff, S.C. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger, C.S., Teh, S.J. ja Hinton, D.E. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287–1293.

(19) Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K. ja Tanaka, M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley, K. ja Teather, K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330–338.

(21) Käesoleva lisa peatükk C.15 „Kala embrüo ja rebukotiga vastsetega tehtav lühiajaline toksilisuse katse“.

(22) Käesoleva lisa peatükk C.37 „21-päevane katse kaladega: lühiajaline sõelkatse östrogeense ja androgeense toime ning aromataasi inhibeerimise kontrollimiseks“.

(23) Käesoleva lisa peatükk C.41 „Kalade sugulise arengu katse“.

(24) Käesoleva lisa peatükk C.48 „Lühiajaline kalade paljunemise katse“.

(25) Käesoleva lisa peatükk C.47 „Varases arengujärgus kaladele avalduva mürgisuse katse“.

(26) Käesoleva lisa peatükk C.49 „Ägeda mürgisuse katse kalaembrüotega“.

(27) Wheeler, J.R., Panter, G.H., Weltje, L. ja Thorpe, K.L. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067–1076.

(28) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M. ja Iguchi, T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301–308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(30) Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M. ja Schartl, M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A., Otake, H., Togashi, K., Hamaguchi, S. ja Sakaizumi, M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations. Zoological Science 21: 613–619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (väljaande lisad on avaldatud eraldi dokumendina), OECD Publishing, Pariis.

(33) Green, J.W., Springer, T.A., Saulnier, A.N. ja Swintek, J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108–1116.

▼**M8**

1. liide

MÕISTED

Asustustihedus – kalade arv vee ruumalaühiku kohta.

Biomassisisaldus – kalade märgmass vee ruumalaühiku kohta.

ECx (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC50 on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

ELISA – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs.

HAS-telg – hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg.

IACUC – Institutional Animal Care and Use Committee (institutsionaalne loomade hooldamise ja kasutamise komitee).

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit).

Kemikaal – aine või segu.

Kooruvus – vastkoorunud isendite arv: inkubaatorisse pandud embrüote arv.

Letaalne mediaankontsentratsioon (LC50) – uuritava kemikaali hinnanguline kontsentratsioon, mille juures kemikaal on katse vältel letaalne 50 %-le katseorganismidest.

Läbivoolukatse – katse, mille puhul katselahused voolavad kokkupuuteperioodi vältel pidevalt läbi katsesüsteemi.

Pikkus sabauime hargnemiskohani – kala pikkus ninamiku tipust kuni sabauime keskmiste kiirte otsani; kasutatakse kalade puhul, kelle selgroo lõppemiskohta on keeruline kindlaks teha (www.fishbase.org).

Sigivus – marjaterade arv.

SMILES – Simplified Molecular Input Line Entry Specification (lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem).

Standardpikkus – kala pikkus ninamiku tipust viimase selgroolüli tagaotsani või hüpuraalplaadi külje keskosa tagaotsani. Lihtsamalt öeldes ei hõlma see pikkus sabauime pikkust (www.fishbase.org).

Täheldatava toime puudumise kontsentratsioon (NOEC) – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) toimet ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni.

▼**M8**

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

Viljakus – eluvõimeliste marjaterade arv: sigivus.

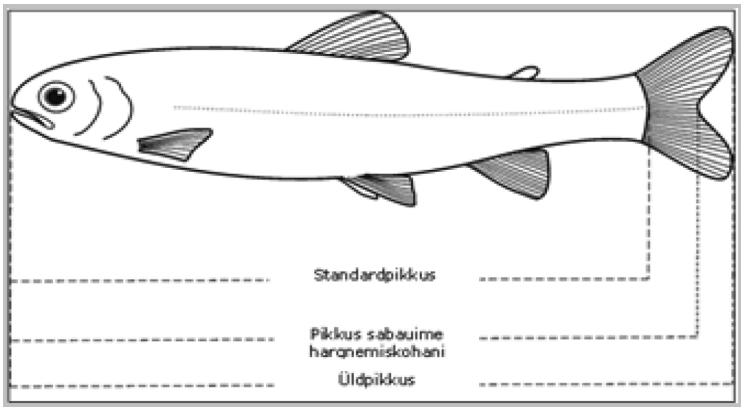
VTG – vitellogeniin on fosfolipoglükoproteiin, mis on munarebu valkude eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikide ovipaarsete liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

Vähima täheldatud toime avaldumise kontsentratsioon (LOEC) – uuritava kemikaali väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peaks kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon) on valitud. Sellekohased juhised on esitatud 5. ja 6. liites.

Üldpikkus – kala pikkus ninamiku tipust sabauime pikema hõlma tipuni; tavaliselt surutakse hõlmad mõõtmiseks keskjoonele kokku. Seda pikkust mõõdetakse piki sirgjoont, mitte mööda keha kumerust (www.fishbase.org).

Joonis 1.

Kasutatavate eri pikkuste kirjeldus



▼**M8**

2. liide

MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED OMADUSED

Koostisosa	Piirsisaldus
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Kloorijäägid	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

▼**M8**

3. liide

MEOGRT PUHUL KASUTATAVAD KATSETINGIMUSED

1. Soovitatav liik	Jaapani riisikala (*Oryzias latipes*)
2. Katse tüüp	Pideva läbivooluga katse
3. Vee temperatuur	Nominaalne katsetemperatuur on 25 °C. Kogu katseperioodi keskmine temperatuur igas nõus on 24–26 °C.
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga ja valgusvooga ~150 lm/m^2) (valgustihedusega ~150 lx).
5. Valgusrežiim	16 tundi valgust, 8 tundi pimedust
6. Biomassisisaldus	F0: 2 täiskasvanut paralleelnõu kohta; F1: alguses kuni 20 marjatera (embrüot) paralleelnõu kohta, pärast koorumist 12 embrüot paralleelnõu kohta, seejärel sigimisetapis 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal 2 täiskasvanut (XX-XY sigimispaar)
7. Katsekambri minimaalne kasutatav ruumala	1,8 l (nt katsekamber suurusega 18 x 9 x 15 cm)
8. Katselahuse uuendamine kogu ruumala ulatuses	Vähemalt 5 ja kuni 16 lahuse uuendamist päevas (või vooluhulk 20 ml/min)
9. Katseorganismide vanus katse alguses	F0: > 12. viljastamisjärgne nädal, aga soovitatavalt mitte rohkem kui 16. viljastamisjärgne nädal
10. Organismide arv paral leelnõu kohta	F0: 2 kala (isase ja emase paar); F1: kuni 20 kala (marjatera) paralleelnõu kohta (saadud põlvkonna F0 või F1 sigimispaaridelt)
11. Kontsentratsioonirühmade arv	5 uuritava kemikaaliga töödeldavat kontsentratsioonirühma ja vajalikud kontrollrühmad
12. Paralleelnõudearv kont sentratsioonirühma kohta	Vähemalt 6 paralleelnõud uuritava kemikaali kontsentratsioonirühma kohta ja vähemalt 12 paralleelnõud kontrollrühma ja lahustiga kontrollrühma (kui kasutatakse) kohta (põlvkonna F1 sigimisetapil paralleelnõude arv kahekordistatakse)
13. Organismide arv katses	Vähemalt 84 kala põlvkonnas F0 ja 504 kala põlvkonnas F1. (Lahustiga kontrolli kasutamise korral 108 kala põlvkonnas F0 ja 648 kala põlvkonnas F1.) Loendatav üksus on eelvastsejärgule järgnevas arengujärgus olev vastne.
14. Söötmisrežiim	Kaladele söödetakse piiramatus koguses soolase vee krevettide (*Artemia* spp.) 24 tunni vanuseid noorjärgus isendeid, millele vajadusel lisatakse kaubanduslikult müüdavat helvessööta (tõhusat paljunemist toetava kasvu ja arengu tagamiseks sobiva söötmisgraafiku näide on esitatud 5. liites).

▼**M8**

15. Aereerimine	Üksnes siis, kui lahustunud hapniku sisaldus hakkab langema alla 60 % küllastuskontsentratsioonist
16. Lahjendusvesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või deklooritud kraanivesi
17. Kokkupuuteaeg	Esmaselt 19 nädalat (põlvkonnast F0 kuni põlvkonna F2 koorumiseni)
18. Bioloogilised lõppnäitajad (esmased)	Kooruvus (F1 ja F2); ellujäämus (F1, koorumisest kuni 4. viljastamisjärgse nädalani (vastsejärgu lõpp / maimujärgu algus), 4. kuni 9. (või 10.) viljastamisjärgse nädalani (maimust noorkalaks) ja 9. kuni 15. viljastamisjärgse nädalani (noorkalast kuni täiskasvanud kalade surmamiseni)); kas (F1, pikkus ja mass 9. ja 15. viljastamisjärgsel nädalal); teisesed sootunnused (F1, pärakuuime papillaarjätked 9. ja 15. viljastamisjärgsel nädalal); vitellogeniin (F1, *vtg* mRNA või VTG valk 15. viljastamisjärgsel nädalal); fenotüübiline sugu (F1, sugunäärme histoloogia põhjal 15. viljastamisjärgsel nädalal); paljunemine (F0 ja F1, sigivus ja viljakus 21 päeva vältel); aeg kudemiseni (F1); histopatoloogia (F1, sugunääre, maks ja neerud 15. viljastamisjärgsel nädalal)
19. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid	Lahustunud hapniku sisaldus ≥ 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist; vee keskmine temperatuur kogu katse vältel 24–26°C; sigimise õnnestumine ≥ 65 % kontrollrühma(de) emaste puhul; keskmine päevane sigivus kontrollrühma(de)s ≥ 20 marjatera; keskmine kooruvus kontrollrühmades ≥ 80 % (nii põlvkonnas F1 kui ka põlvkonnas F2); kontrollrühmades keskmine koorumisjärgne ellujäämus 3. viljastamisjärgse nädalani ≥ 80 % ja 3. viljastamisjärgsest nädalast kuni surmamiseni ≥ 90 % (F1); uuritava kemikaali kontsentratsioon lahuses peab olema püsivalt vahemikus ± 20 % keskmisest mõõdetud väärtusest.

▼M8

4. liide

TÜÜPILISTE KONTROLLVÄÄRTUSTEGA SEOTUD JUHISED

Tuleb arvestada, et nimetatud kontrollväärtused põhinevad vähesel arvul valideerimisuuringutel ja neid võidakse täiendavate kogemuste valguses muuta.

Kasv

Kõigi proovis sisalduvate kalade massi ja pikkust mõõdetakse 9. (või 10.) ja 15. viljastamisjärgsel nädala. Kirjeldatud katse-eeskirjast lähtuvalt peaks kalade eeldatav märgmass 9. viljastamisjärgsel nädala olema isaste puhul 85–145 mg ja emaste puhul 95–150 mg. Eeldatav mass 15. viljastamisjärgsel nädalal peaks olema isaste puhul 250–330 mg ja emaste puhul 280–350 mg. Üksikisendite puhul võib küll esineda märkimisväärseid kõrvalekaldeid esitatud vahemikest, aga kui mõne kontrollrühma kaalutud keskmine näitaja peaks jääma nendest vahemikest oluliselt väljapoole, siis võib see osutada probleemidele, mis on tingitud söötmisest, temperatuuri reguleerimisest, vee kvaliteedist, haigustest või nende tegurite mis tahes kombinatsioonist.

Koorumine

Koorumise edukuse määr kontrollrühmades on üldjuhul 90 % kandis, kuid ka 80 % tase ei ole ebatavaline. Kui koorumise edukus jääb alla 75 %, võib see osutada arenevate marjaterade puudulikule loksutamisele või marjaterade hooletule käitlemisele (nt surnud marjaterade õigel ajal eemaldamata jätmine, mis põhjustab seentega saastumist).

Ellujäämus

Ellujäämus koorumisest kuni 3. viljastamisjärgse nädalani ja sealt edasi on kontrollrühmades tavaliselt vähemalt 90 %, kuid ka 80 % ellujäämus kontrollrühma kalade varastes elujärkudes ei ole veel probleem. Muret tuleks tunda juhul, kui kontrollrühmades jääb ellujäämus alla 80 %, sest see võib osutada akvaariumide puudulikule puhastamisele, mis põhjustab kalavastsete surma haiguste või vähese lahustunud hapniku sisaldusest tingitud lämbumise tõttu. Suremust võivad põhjustada ka katsenõu puhastamise käigus tekitatud vigastused ja kalavastsete sattumine nõu äravoolusüsteemi.

Vitellogeniini geen

Kui *vitellogeniini* (*vtg*) geeni absoluuttasemed, mida väljendatakse koopiate arvuna ühe nanogrammi mRNA üldkoguse kohta, võivad erinevate kasutatavate menetluste või seadmete tõttu laborite vahel suuresti erineda, siis suhtarvuna peaks kontrollrühmades emaste kalade *vtg* tase olema ligi 200 korda kõrgem kui isastel. Vahel võivad emaste ja isaste näitajad erineda lausa 1 000–2 000 korda, aga alla 200 jääv suhtarv võib osutada probleemidele proovi saastumisega või kasutatud menetluse ja/või reaktiividega.

Teisesed sootunnused

Isaste kalade puhul on teiseste sootunnuste (papillaarjätketega lülide arv pärakuuime kiirtel) normaalvahemik 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal 40–80 papilaarjätketega lüli. 15. viljastamisjärgseks nädalaks peaks see näitaja kontrollrühma isastel olema vahemikus 80–120 ja emastel 0. Teadmata põhjustel võivad mõnel üksikul isasel papilaarjätked puududa 9. viljastamisjärgsel nädalal, aga kuna kõigil kontrollrühma isastel kujunevad need välja 15. viljastamisjärgseks nädalaks, siis on see kõige tõenäolisemalt tingitud hilisest arengust. Kui papillaarjätkeid leitakse ka kontrollrühma emastelt, siis osutab see XX-isaste esinemisele populatsioonis.

▼**M8**

XX-isased

XX-isaste tavapärane esinemissagedus temperatuuril 25°C kasvatatud kalade seas näib olevat kuni 4 % ning kõrgematel temperatuuridel see suureneb. Tuleks rakendada sobivaid meetmeid, et XX-isaste osakaalu populatsioonis vähendada. Kuna XX-isaste esinemine on arvatavasti seotud geneetiliste ja pärilike põhjustega, saab nende esinemist populatsioonis tõhusalt vähendada kasvatatava kalavaru jälgimisega ja XX-isaste väljapraakimisega kalade paljundamisel.

Kudemisaktiivsus

Enne sigivuse hindamist tuleks kudemisaktiivsust kontrollrühma paralleelnõudes iga päev jälgida. Kudemisaktiivsuse tundemärkide esinemist saab kontrollrühma paaridel vaatluse teel kvalitatiivselt hinnata. Enamik kontrollrühma paare peaks olema alustanud kudemist 12.–14. viljastamisjärgseks nädalaks. Kui selleks ajaks tekkinud kudevate paaride arv on väike, osutab see probleemidele kalade tervise, suguküpsuse või heaoluga.

Sigivus

Terved ja hästi söödetud riisikalad koevad 12.–14. viljastamisjärgsel nädalal üldjuhul iga päev, andes päevas 15–50 marjatera. Kontrollrühma soovituslikust 24 sigimispaarist 16 (> 65 %) peaks väljutama päevas rohkem kui 20 marjatera paari kohta ning see näitaja võib tõusta ka ligi 40 marjaterani päevas. Osutatud tasemest väiksem sigivus võib osutada sigimispaaride ebaküpsusele, alatoitumisele või haigustele.

Viljakus

Kontrollrühmas on viljastatud marjaterade osakaal tavaliselt 90 % kandis, aga haruldane ei ole ka 95 % või sellest kõrgem määr. Kui kontrollrühma marjaterade viljakus jääb alla 80 %, võib see osutada isendite haigustele või ebasoodsatele kasvatustingimustele.

▼**M8**

5. liide

SÖÖTMISGRAAFIKU NÄIDE

Tabelis 1 on esitatud kalade tõhusat paljunemist toetava kasvu ja arengu tagamiseks sobiva söötmisgraafiku näide. Kõrvalekalded esitatud söötmisgraafikust võivad olla lubatud, aga soovitatavalt tuleks sel juhul katseliselt kontrollida, kas kasvu ja paljunemise näitajad jäävad nõutud tasemele. Soovitatud söötmisgraafiku järgimiseks tuleb enne katse algust kindlaks teha soolase vee krevettide kuivmass seda sisaldava vedelsööda mahuühiku kohta. Selleks võib kaaluda kindlaksmääratud koguse soolase vee krevette sisaldavat vedelsööta, mida on teadaoleva kaaluga alustel 60 °C juures 24 tundi kuivatatud. Vedelsöödas sisalduvate soolade massi arvessevõtmiseks kuivatatakse ka sama kogus vedelsööda valmistamiseks kasutatud soolalahust, mille kuivatamisjärgne mass lahutatakse soolase vee krevette sisaldava vedelsööda kuivatamisjärgsest massist. Teise variandina võib soolase vee krevette enne kuivatamist filtreerida ja destilleeritud veega loputada, et poleks vaja mõõta puhta soolalahuse massi. Saadud andmete põhjal teisendatakse soolase vee krevettide kuivmass tabeli järgi iga kala kohta arvestatud, soolase vee krevette sisaldava vedelsööda koguseks. Lisaks soovitatakse soolase vee krevette sisaldava vedelsööda alikvoote igal nädalal uuesti kaaluda, et kontrollida söödetava krevetikoguse kuivmassi õigsust.

Tabel 1.

Söötmisgraafiku näide

Aeg (pärast koorumist)	Soolase vee krevettide kogus (kuivmassi mg kala kohta päevas)
1. päev	0,5
2. päev	0,5
3. päev	0,6
4. päev	0,7
5. päev	0,8
6. päev	1,0
7. päev	1,3
8. päev	1,7
9. päev	2,2
10. päev	2,8
11. päev	3,5
12. päev	4,2
13. päev	4,5
14. päev	4,8
15. päev	5,2
16.–21. päev	5,6

▼**M8**

Aeg (pärast koorumist)	Soolase vee krevettide kogus (kuivmassi mg kala kohta päevas)
4. nädal	7,7
5. nädal	9,0
6. nädal	11,0
7. nädal	13,5
8. nädal – surmamine	22,5

▼**M8**

6. liide

MARJATERADE INKUBATSIOONIKAMBRI NÄIDISED

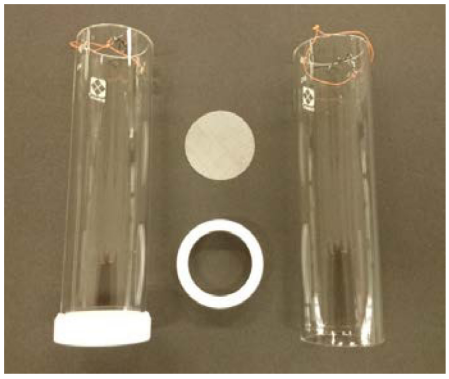
Näidis A





See inkubaator koosneb ristuva kinnitusega tsentrifuugiklaasist, mida ühendab roostevabast terasest hülss ja hoiab paigal keeratav tsentrifuugikork. Korki läbib väike klaasist või roostevabast terasest toru, mis ulatub peaaegu tsentrifuugiklaasi ümara põhjani ning mille kaudu puhutakse õhumulle marjaterade suspendeerimiseks, saprofüütiliste seennakkuste leviku tõkestamiseks ning ka kemikaalide vahetamiseks inkubaatori ja seda sisaldava nõu vahel.

Näidis B



▼**M8**



See inkubaator koosneb klaassilindrist (läbimõõt 5 cm ja pikkus 10 cm) ja roostevabast sõelast (sõelumiskoefitsient 0,25 φ ja tihedus 32), mis kinnitatakse silindri põhja külge PTFE-võru abil. Tõstelati külge kinnitatud inkubaatorid langetatakse katsenõudesse ja neid loksutatakse vertikaalselt (u 5 cm amplituudiga) riisikala marjaterade jaoks sobiva sagedusega (u üks kord 4 s jooksul).

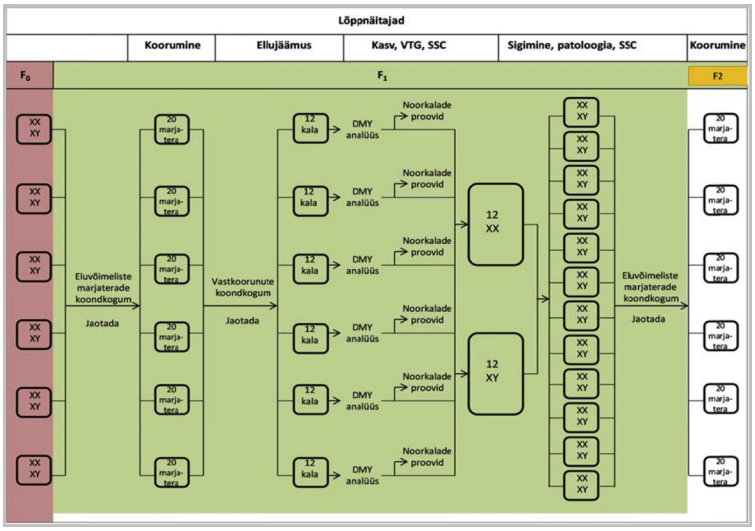
▼M8

7. liide

MEOGRT PUHUL KASUTATAV PARALLEELPROOVIDE KOONDAMISE JA MOODUSTAMISE SKEEM

Joonis 1.

Paralleelproovide koondamine ja moodustamine MEOGRT puhul. Joonisel kujutatu vastab ühele kontsentratsioonirühmale või poolele kontrollrühmast. Koondamise tõttu ei ole paralleelproovid kogu katse vältel pidevalt eraldi jälgitavad. Mõistet „marjatera“ kasutatakse eluvõimelise viljastatud marjatera tähenduses (samaväärne embrüoga)



Kontsentratsioonirühmad ja paralleelproovid

Katsemeetodis soovitatakse kasutada tehniliselt puhaste materjalidega viit uuritava kemikaali kontsentratsioonirühma ja negatiivset kontrolli. Paralleelproovide arv kontsentratsioonirühma kohta ei ole MEOGRTs alati ühetaoline ja kontrollrühma paralleelproovide arv peaks olema kaks korda suurem kui uuritava kemikaali ühes kontsentratsioonirühmas. Põlvkonnas F0 on uuritava kemikaali igas kontsentratsioonirühmas kuus paralleelproovi ja negatiivse kontrolli rühmas 12 paralleelproovi. Lahustite kasutamist soovitatakse võimalusel alati vältida, aga nende kasutamise korral tuleb MEOGRT protokollis esitada nii lahusti kasutamise kui ka kasutatud lahusti valiku põhjendus. Lisaks on lahusti kasutamise korral vaja kahte liiki kontrollrühmasid: a) lahustiga kontroll ja b) negatiivne kontroll. Mõlemas kontrollrühmas peaks olema MEOGRT kõigis etappides täiskomplekt paralleelproove. Kirjeldatud paralleelproovide struktuur jääb samaks põlvkonna F1 katseorganismi kogu kasvuperioodi vältel (ja põlvkonnas F2 kuni selle koorumiseni). Ent täiskasvanud põlvkonna F1 sigimispaaride moodustamise ajal tuleks paralleelsete sigimispaaride arv igas kontsentratsioonirühmas võimaluse korral kahekordistada. See tähendab, et igas uuritava kemikaali kontsentratsioonirühmas oleks 12 paralleelset paari ja kontrollrühmas oleks 24 paralleelset paari (lisaks vajaduse korral 24 paralleelset paari lahusti kontrollrühmas). Generatsiooni F1 paaride koetud embrüote koorumine tehakse kindlaks sama paralleelproovide struktuuri alusel nagu põlvkonna F0 koetud embrüote koorumisel, s.t algselt kuus paralleelproovi uuritava kemikaali iga kontsentratsioonirühma kohta ja 12 paralleelproovi kontrollrühma(de)s.

▼**M8**

8. liide

PÄRAKUUIME PAPILLAARJÄTKETE LOENDAMINE

Peamised materjalid ja reaktiivid

— Stereomikroskoop (soovi korral koos kaameraga)

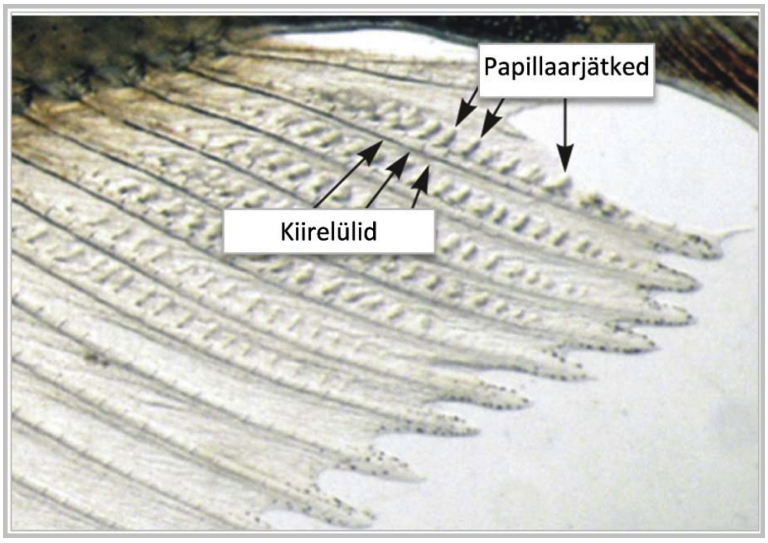
— Fiksaator (soovitavalt Davidsoni fiksaator, Bouini fiksaatori kasutamine pole soovitav) juhul, kui jätkeid ei loendata pildilt

Loendamise kord

Pärast lahangut tuleks pärakuuime pildistada, et pärakuuime papillaarjätkeid oleks lihtsam loendada. Kuigi pildistamine on soovitatav meetod, võib teise variandina pärakkuuime Davidsoni või muus sobivas fiksaatoris ligikaudu ühe minuti jooksul fikseerida. Papillaarjätkete loendamise lihtsustamiseks tuleb hoida pärakuuime fikseerimise ajal tasapinnalisena. Pärakuuimega rümpa võib säilitada Davidsoni või muus sobivas fiksaatoris kuni analüüsimiseni. Loendada tuleb uime kiirelüli tagumiselt servalt välja ulatuvate papillaarjätketega kiirelülide arv (vt **joonis 1**).

Joonis 1.

Pärakuuime papillaarjätked



▼M8

9. liide

MEOGRT ÜKSIKASJALIK AJAKAVA

1.–3. katsenädal (põlvkond F0)

Valikukriteeriumidele vastavad (vt punktid 16–20) põlvkonna F0 kudevad kalad kaasatakse katsesse kolmeks nädalaks, et arenevad sugurakud ja sugunäärmekoed saaksid uuritava kemikaaliga kokku puutuda. Igas paralleelnõus on üks sigiv kalapaar (XX-emase ja XY-isase sigimispaar). Paari koetud marjaterasid kogutakse, loendatakse ja nende viljakust hinnatakse 21 järjestikusel päeval alates 1. katsepäevast.

4. katsenädal (põlvkonnad F0 ja F1)

Eelistatavalt tuleks katse järgmisel etapil kasutatavad viljastatud ja eluvõimelised marjaterad (embrüod) koguda ühel päeval, kuid embrüote ebapiisava arvu korral võib neid siiski koguda ka kahe päeva vältel. Kahel päeval kogumise korral pannakse kõik esimesel päeval kogutud embrüod kontsentratsioonirühmade lõikes kokku teisel päeval kogutud embrüotega. Kõik kontsentratsioonirühma jaoks moodustatud koondkogumis olevad embrüod jaotatakse juhuslikult selle rühma paralleelsete inkubaatorite vahel nii, et igas inkubaatoris on 20 embrüot. Viljastatud marjaterade (embrüote) suremust kontrollitakse ja registreeritakse iga päev. Surnud marjaterad eemaldatakse inkubaatoritest (viljastatud marjaterade surma näitab eelkõige varastes etappides märkimisväärne läbipaistvuse kadu ja värvuse muutus, mis on põhjustatud valkude koaguleerumisest ja/või sadenemisest ja mille tulemusena marjaterad muutuvad valgeks ja läbipaistmatuks; OECD 2010).

Märkus. Kui marjaterasid on vaja koguda kahel päeval ainult ühe kontsentratsioonirühma puhul, tuleb seda kogumismenetlust kasutada kõikide kontsentratsioonirühmade (ja kontrollrühmade) puhul. Kui ka pärast teist kogumispäeva ei ole mõnes kontsentratsioonirühmas piisavalt embrüoid, et panna igasse inkubaatorisse 20 embrüot, siis tuleb selles konkreetses kontsentratsioonirühmas vaadeldavate embrüote arvu vähendada 15 embrüoni inkubaatori kohta. Kui embrüoid ei jätku ka juhul, kui igas inkubaatoris oleks 15 embrüot, tuleb vähendada paralleelsete inkubaatorite arvu nii, et igasse inkubaatorisse saaks panna 15 embrüot. Lisaks võib põlvkonnas F0 kasutada iga kontsentratsiooni- ja kontrollrühma kohta rohkem sigimispaare, et suurendada saadavate marjaterade arvu ja saavutada soovitatav tase 20 marjatera paralleelnõu kohta.

Põlvkonna F0 sigimispaarid surmatakse 24. katsepäeval humaanselt ning nende kehamass ja pikkus registreeritakse. Vajaduse korral võib põlvkonna F0 sigimispaare veel 1–2 päeva elus hoida, et põlvkonna F1 sigitamist korrata.

5.–6. katsenädal (põlvkond F1)

Üks kuni kaks päeva enne eeldatavat koorumise algust peatatakse inkubeeritavate marjaterade loksutamine või vähendatakse seda, et koorumist kiirendada. Igal päeval embrüost koorunud vastsed kogutakse kontsentratsioonirühmade lõikes koondkogumitesse ning jaotatakse süstemaatiliselt vastava kontsentratsioonirühma paralleelsete vastsenõude vahel nii, et ühes nõus on kuni 12 vastkoorunud isendit. Selleks valitakse vastkoorunud isendeid juhuslikkuse põhimõttel ning lisatakse need üksteise järel vastava kontsentratsioonirühma juhuslikult valitud paralleelnõudesse, kuni igas paralleelnõus on 12 vastkoorunud isendit. Kui vastkoorunud isenditest ei jätku kõikide paralleelnõude täitmiseks, tuleb tagada, et etapi F1 alguses oleks võimalikult paljudes paralleelnõudes 12 vastkoorunud isendit.

Marjaterad, mis ei ole koorunud kontrollrühma koorumispäeva mediaaniga võrreldes kaks korda pikema aja jooksul, tunnistatakse eluvõimetuks ja jäetakse kõrvale. Vastkoorunud isendite arv registreeritakse ja iga paralleelnõu kohta arvutatakse koorumise edukuse määr (kooruvus).

▼M8

7.–11. katsenädal (põlvkond F1)

Kalavastsete ellujäämust kontrollitakse ja registreeritakse iga päev kõikide paralleelnõude puhul. 43. katsepäeval registreeritakse igas paralleelnõus ellu jäänud kalade arv ja algselt paralleelnõusse asetatud vastkoorunud isendite arv (soovitatavalt 12). Selle põhjal saab arvutada protsentuaalse ellujäämuse koorumisest kuni noorkala arengujärguni.

12. katsenädal (põlvkond F1)

Katsepäevadel 78–85 võetakse iga kala sabauimest väike koeproov (uimetükk), mille põhjal tehakse kindlaks kõikide isendite genotüübiline sugu. Selle teabe põhjal moodustatakse sigimispaarid.

Kolme päeva jooksul pärast iga kala genotüübilise soo kindlakstegemist moodustatakse juhuslikkuse põhimõttel 12 sigimispaari iga kontsentratsioonirühma ja 24 sigimispaari kontrollrühma kohta. Igast paralleelnõust valitakse juhuslikult kaks XX- ja XY-kala, need rühmitatakse soo järgi koondkogumiteks ja sigimispaarid (XX-XY paarid) moodustatakse kummastki koondkogumist juhuslikult valitud kaladest Moodustatakse 12 paralleelset paari kemikaali iga kontsentratsioonirühma ja 24 paralleelset paari kontrollrühma kohta ning igasse paralleelnõusse pannakse üks sigimispaar. Kui mõni paralleelnõu ei sisalda koondkogumisse lisamiseks kahte XX- või XY-kala, tuleb sobiva soolise genotüübiga kalad võtta sama kontsentratsioonirühma teistest paralleelnõudest.

Ülejäänud kalad (kuni kaheksa kala paralleelnõu kohta) surmatakse humaanselt ja neil mõõdetakse noorkala arengujärgu lõppnäitajad. Kõikide noorkalaproovide *dmy* andmed (XX või XY) säilitatakse, et tagada võimalus seostada kõiki lõppnäitajate andmeid iga isendi geneetilise sooga.

13.–14. katsenädal (põlvkond F1)

Kokkupuude kemikaaliga jätkub kogu selle aja vältel, mil sigimispaarid arenevad noorkalast täiskasvanuks. 98. katsepäeval (st üks päev enne marjaterade kogumise algust) eemaldatakse akvaariumidest ja emaste kalade küljest kõik seal olevad marjaterad.

15.–17. katsenädal (põlvkond F1)

Koetud marjaterasid kogutakse igast paralleelnõust 21 järjestikuse päeva jooksul ning hinnatakse nende sigivust ja viljakust.

18. katsenädal (4. nädala tegevuste kordus) (põlvkonnad F1 ja F2)

120. katsepäeva hommikul kogutakse igast paralleelnõust marjaterad. Kogutud marjaterasid hinnatakse, viljastatud marjaterad rühmitatakse (pärast kuduniitide eemaldamist) kontsentratsioonirühmade lõikes koondkogumiteks ning jaotatakse sealt süstemaatiliselt inkubatsioonikambritesse nii, et igas inkubaatoris on 20 viljastatud marjatera. Inkubaatorid võib asetada iga kontsentratsioonirühma jaoks ette valmistatud eraldi inkubatsiooninõudesse või paralleelnõudesse, kuhu hiljem jäävad ka koorunud vastsed. Eelistatavalt tuleks embrüod koguda ühel päeval, aga kui nende arv ei ole piisav, võib embrüoid koguda ka kahe päeva vältel. Kahel päeval kogumise korral pannakse kõik esimesel päeval kogutud embrüod kontsentratsioonirühmade lõikes kokku teisel päeval kogutud embrüotega. Kõik kontsentratsioonirühma jaoks moodustatud koondkogumis olevad embrüod jaotatakse juhuslikult selle rühma paralleelsete inkubaatorite vahel nii, et igas inkubaatoris on 20 embrüot. Märkus. Kui marjaterasid on vaja koguda kahel päeval ainult ühe kontsentratsioonirühma puhul, tuleb seda kogumismenetlust kasutada kõikide kontsentratsioonirühmade (ja kontrollrühmade) puhul. Kui ka pärast teist kogumispäeva ei ole mõnes kontsentratsioonirühmas piisavalt

▼**M8**

embrüoid, et panna igasse inkubaatorisse 20 embrüot, siis tuleb selles konkreetses kontsentratsioonirühmas vaadeldavate embrüote arvu vähendada 15 embrüoni inkubaatori kohta. Kui embrüoid ei jätku ka juhul, kui igas inkubaatoris oleks 15 embrüot, tuleb vähendada paralleelsete inkubaatorite arvu nii, et igasse inkubaatorisse saaks panna 15 embrüot.

121. katsepäeval (või 122. katsepäeval, kui on vaja veenduda, et põlvkonna F2 sigitamine õnnestus) surmatakse põlvkonna F1 sigimispaarid humaanselt ja neil mõõdetakse täiskasvanud kalade arengujärgu lõppnäitajad. Vajaduse korral võib põlvkonna F1 sigimispaare veel 1–2 päeva elus hoida, et põlvkonna F2 sigitamist korrata.

19.–20. katsenädal (põlvkond F2)

Üks kuni kaks päeva enne eeldatavat koorumise algust peatatakse inkubeeritavate marjaterade loksutamine või vähendatakse seda, et koorumist kiirendada. Kui katse lõpeb põlvkonna F2 koorumisega, siis iga päev koorunud vastsed loendatakse ja seejärel kõrvaldatakse. (Embrüod, mis ei ole ka pikendatud inkubatsiooniaja – st kontrollrühma koorumispäeva mediaaniga võrreldes kaks korda pikema aja – järel koorunud, tunnistatakse eluvõimetuks.)

▼M8

10. liide

STATISTILINE ANALÜÜS

MEOGRTga kogutavad bioloogiliste andmete kategooriad ei ole sellele katsele eriomased ja, kui patoloogiate andmed välja arvata, siis on sarnaste andmete nõuetekohaseks analüüsimiseks välja töötatud palju sobivaid statistilisi meetodeid, mille valik sõltub andmete omadustest: normaaljaotus, dispersiooni homogeensus, uuringuplaani sobivus hüpoteesi kontrollimiseks või regressioonanalüüsiks, parameetrilisteks või mitteparameetrilisteks testideks jne. Üldpõhimõttena on soovitatavad statistilised analüüsimeetodid valitud lähtuvalt ökotoksilisuse andmeid käsitlevast OECD juhendist (OECD 2006) ning joonisel 2 on esitatud MEOGRT andmete jaoks analüüsimeetodi valimise vooskeem.

Võib eeldada, et kõige sagedamini esinevad andmestikes monotoonsed sõltuvused. Lisaks tuleks kaaluda, kas kasutada ühepoolset või kahepoolset statistilist testi. Üldiselt soovitatakse kasutada ühepoolseid teste, välja arvatud juhul, kui need on mingil bioloogilisel põhjusel sobimatud. Käesolevas jaotises soovitatakse küll teatavaid statistilisi teste, aga kui konkreetselt MEOGRTga kogutavate andmete jaoks töötatakse välja sobivamad ja/või võimsamad statistilised meetodid, tuleks nendest saadavate eeliste tõttu kasutada vastavaid uusi statistilisi teste.

MEOGRTga kogutavaid andmeid tuleks analüüsida iga genotüübilise soo lõikes eraldi. Pööratud sooga kalade (XX-isaste või XY-emaste) kohta kogutud andmete analüüsimiseks on kaks võimalikku strateegiat. 1) Jätta pööratud sooga kalade andmed (välja arvatud pööratud sooga kalade osakaal igas paralleelproovis) kogu katse ulatuses analüüsist välja. 2) Jätta kõikide pööratud sooga kalade kohta kogutud andmed andmestikku sisse ja teha analüüs genotüübi põhjal.

Histopatoloogilised andmed

Histopatoloogilised andmed esitatakse raskusastme kujul, mida analüüsitakse hiljuti välja töötatud uue statistilise meetodiga: Rao-Scotti kohandusega Cochrane'i-Armitage lõiktest (RSCABS) (Green *et al*., 2014). Rao-Scotti kohandus säilitab teabe katseparalleelide kohta; lõiktesti menetlusega on arvesse võetud bioloogilist eeldust, et kemikaali kontsentratsioonide suurenedes kasvab ka raskusaste. RSCABSi tulemused näitavad iga diagnoosi puhul, millises kontsentratsioonirühmas on patoloogiate osakaal suurem kui kontrollrühmas ja milline on nende raskusaste.

Sigivuse andmed

Andmete monotoonse kontsentratsioonist sõltuvuse korral kasutatakse sigivuse analüüsides sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra või Williamsi testi. Sammuviisilise elimineerimise testis tehakse kõik võrdlused olulisuse nivool 0,05 ja puuduvad võrdluste arvust sõltuvad kohandused. Eeldatakse, et andmete puhul esineb monotoonne kontsentratsioonist sõltuvus, aga seda saab ka kontrollida andmete visuaalse vaatlusega või pärast andmete järkudeks teisendamist kontsentratsioonirühmade keskväärtuste lineaar- ja ruutkontrastide konstrueerimise teel. Kui ei esine olukorda, kus ruutkontrast on oluline ja lineaarkontrast ei ole oluline, siis kasutatakse trenditesti. Muul juhul kasutatakse kemikaali toime kindlakstegemiseks Dunnetti testi – tingimusel, et andmed on normaaljaotuse ja homogeense dispersiooniga. Kui nimetatud tingimused ei ole täidetud, kasutatakse Dunni testi koos Bonferroni-Holmi kohandusega. Kõik osutatud testid tehakse F-testist või Kruskali-Wallise testist sõltumatult. Täpsemad üksikasjad on esitatud dokumendis OECD 2006.

▼M8

Piisava statistilise põhjendatuse korral võib kasutada ka muid meetodeid, näiteks marjaterade arvu puhul üldistatud lineaarset mudelit koos vigade Poissoni jaotusega (Cameron ja Trividi, 2013). Muu meetodi kasutamise korral on soovitatav nõu pidada statistikutega.

Igapäevane marjaterade loendus ühes põlvkonnas

Kasutatakse dispersioonanalüüsi (ANOVA) mudelit, kus tunnus Y = Aeg*Aeg+-Kontsentratsioon + *Kontsentratsioon + Aeg*Kontsentratsioon + *Aeg*Kontsentratsioon ja juhuslik mõju avaldub tegurites Paralleelproov(Põlvkond*Kontsentratsioon) ning Aeg*Paralleelproov(Kontsentratsioon), mis võimaldab põlvkondades mõlemat liiki ebavõrdseid dispersioonikomponente. Tegur Aeg osutab siin marjaterade loendamise sagedusele (nt iga päev või kord nädalas). See on kordusmõõtmiste analüüs, mille puhul sama paralleelproovi kohta tehtud tähelepanekute korrelatsioonid on seotud andmete kordusmõõtmistega.

Kontsentratsiooni peamist mõju kontrollitakse Dunnetti (või Dunnetti-Hsu) testiga, mis on kohandatav vastavalt võrdluste arvule. Lisaks on vaja kohandusi põlvkonna ja aja mõju arvessevõtmiseks, sest nende kahe teguri puhul puudub kontrolltase ning iga tasemete paar võib osutuda huvi pakkuvaks võrdluseks. Kui olulisusnivooga 0,05 F-test näitab nimetatud kahe mõjuteguri puhul olulist peamist mõju, siis saab vastava teguri paare tasemete kaupa võrrelda olulisusnivooga 0,05 ilma täiendavaid kohandusi tegemata.

Mudel hõlmab kahe ja kolme teguriga vastasmõjusid, mistõttu näiteks aja peamine mõju ei pruugi olla statistiliselt oluline, kuigi aeg avaldab olulist mõju tulemustele. Seega kui mõni kahe või kolme teguriga (millest üks on aeg) vastasmõju on nivool 0,05 oluline, siis võib aja tasemete võrdlused olulisusnivool 0,05 sobivaks tunnistada ilma täiendavate kohandusteta.

Järgmiseks uuritakse F-testidega kontsentratsiooni olulisust ajas; need esitatakse dispersioonanalüüsi tabelis nn lõikudena. Kui näiteks põlvkonnas F1 aja 12 jooksul kasutatud kontsentratsiooni lõik on nivool 0,05 oluline, siis võib selle kontsentratsioonirühma võrdlused põlvkonnas F1 ajaga 12 olulisusnivool 0,05 sobivaks tunnistada ilma täiendavate kohandusteta. Sama kehtib nende testide puhul, millega uuritakse aja olulisust põlvkonnas F1 ja kontsentratsioonis ning põlvkonna olulisust ajas ja kontsentratsioonis.

Võrdluste suhtes, mis ei kuulu ühtegi eespool nimetatud kategooriasse, tuleks kasutada Bonferroni-Holmi meetodit p-väärtuste kohandamiseks. Lisateavet taoliste mudelite analüüsimise kohta võib leida allikatest Hocking (1985) ning Hochberg ja Tamhane (1987).

Teine võimalus on registreerida toorandmed ning esitada need uuringuraportis iga päeva kohta kui sigivusnäitaja (marjaterade arv) paralleelproovi kohta. Seejärel tuleks arvutada paralleelproovi toorandmete keskväärtus ja teha sellega ruutjuurteisendus. Paralleelproovide teisendatud keskväärtustega tuleks teha esmalt ühefaktoriline dispersioonanalüüs ning seejärel moodustada Dunnetti kontrastid. Kasulik võib olla ka see, kui vaadelda iga kontsentratsioonirühma ja/või paralleelproovi sigivuse andmeid visuaalselt dispersioonidiagrammil, mis näitab andmete muutumist ajas. See võimaldab esitada mitteformaalseid hinnanguid ajas avalduva võimaliku toime kohta.

Kõik ülejäänud bioloogilised andmed

Statistiliste analüüside aluseks on eeldus, et õigesti valitud dooside korral on andmed monotoonsed. Seega eeldatakse, et andmed on monotoonsed ning nende monotoonsust hinnatakse formaalselt lineaar- ja ruutkontrastidega. Kui andmed on monotoonsed, soovitatakse kasutada paralleelproovide mediaanväärtuste suhtes Jonckheere'i-Terpstra trenditesti (vastavalt dokumendile OECD 2006). Kui ruutkontrast on oluline ja lineaarkontrast ei ole, siis tunnistatakse andmed mittemonotoonseks.

▼**M8**

Kui andmed on mittemonotoonsed ja eriti kui see on tingitud nõrgemast reaktsioonist ühes või kahes kõige kõrgemas kontsentratsioonirühmas, siis tuleks kaaluda võimalust jätta need kontsentratsioonirühmad analüüsiandmestikust välja. Kõnealune otsus tuleb teha pädeva erialase hinnangu põhjal, võttes arvesse kõiki olemasolevaid andmeid, eriti andmeid, mis osutavad asjaomastel kontsentratsioonitasemetel esinevale selgele mürgisusele.

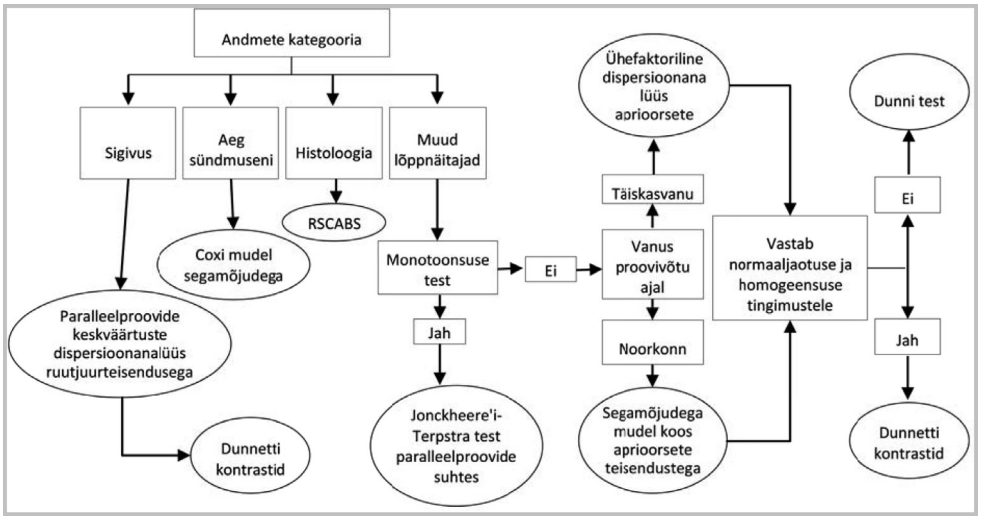
Kehamassi ja pikkuse puhul teisendusi ei soovitata, kuigi need võivad olla mõnikord vajalikud. Vitellogeniini käsitlevate andmete puhul soovitatakse kasutada logaritmteisendust; teiseseid sootunnuseid (pärakuuime papillaarjätked) käsitlevate andmete puhul soovitatakse kasutada ruutjuurteisendust; kooruvust, elulemust, soolist jaotumist ja viljastatud marjaterade osakaalu käsitlevate andmete puhul soovitatakse kasutada arkussiinus-ruutjuurteisendust. Koorumiseni ja esimese kudemiseni kulunud aega tuleks käsitada kui sündmuse toimumiseni kulunud aja andmeid ning andmeid kindla aja jooksul koorumata üksikembrüote või kuduta paralleelproovide kohta kui paremalt tsenseeritud andmeid. Koorumiseni kulunud aeg tuleks arvutada iga paralleelproovi koorumispäeva mediaani põhjal. Nimetatud lõppnäitajaid tuleks analüüsida segamõjudega proportsionaalseid ohte käsitleva Coxi mudeli abil.

Täiskasvanud kalade proovide bioloogilised andmed sisaldavad ühte mõõteväärtust paralleelproovi kohta, st igas paralleelnõus on üks XX-kala ja üks XY-kala. Seetõttu soovitatakse kasutada paralleelproovide keskväärtuste suhtes ühefaktorilist dispersioonanalüüsi. Kui dispersioonanalüüsi eeldused on täidetud (normaaljaotus ja dispersiooni homogeensus, mida hinnatakse dispersioonanalüüsi jääkide põhjal vastavalt Shapiro-Wilksi ja Levene'i testiga), tuleks kontrollrühmast erinevad kontsentratsioonirühmad kindlaks teha Dunnetti kontrastide abil. Ent kui dispersioonanalüüsi eeldused ei ole täidetud, tuleks kontrollrühmast erinevate kontsentratsioonirühmade kindlakstegemiseks kasutada Dunni testi. Sarnast menetlust soovitatakse kasutada protsentuaalsete andmete (viljakus, kooruvus ja ellujäämus) puhul.

Noorkalade proovidest kogutud andmetel on üks kuni kaheksa mõõteväärtust paralleelproovi kohta, st iga genotüübilise soo puhul võib paralleelproovi keskväärtuse arvutamisel aluseks võetud isendite arv olla erinev. Seetõttu soovitatakse kasutada esmalt segamõjuga dispersioonanalüüsi mudelit ja seejärel Dunnetti kontraste – tingimusel, et normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse tingimused on täidetud (segamõjuga dispersioonanalüüsi jääkide põhjal). Kui need tingimused ei ole täidetud, tuleks kontrollrühmast erinevate kontsentratsioonirühmade kindlakstegemiseks kasutada Dunni testi.

Joonis 2.

MEOGRTga kogutud andmete analüüsimiseks soovitatavate statistiliste meetodite vooskeem



▼**M8**

KIRJANDUS

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. (Väljaande lisad on avaldatud eraldi dokumendina.) OECD Publishing, Pariis.

(2) Cameron, A. C., ja Trivedi, P. K. (2013). Regression Analysis of Count Data. 2. väljaanne. Econometric Society Monograph No 53. Cambridge University Press.

(3) Hocking, R. R. (1985). The Analysis of Linear Models. Brooks/Cole, Monterey, CA.

(4) Hochberg, Y., ja Tamhane, A. C. (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53. KULLESTE KASVU JA ARENGU KATSE (LAGDA)

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 241 (2015). Vajadus töötada välja ja valideerida katse, millega saab välja selgitada ja kirjeldada mürgiste kemikaalidega kokkupuute kahjulikke tagajärgi kahepaiksetele, tuleneb kartusest, et kemikaalid võivad juba keskkonnas esineva kontsentratsiooni juures avaldada kahjulikku mõju nii inimesele kui ka elusloodusele. Kulleste kasvu ja arengu katset (LAGDA) käsitlevas OECD katsejuhendis kirjeldatakse kahepaiksete liigiga tehtavat mürgisuse katset, mille käigus vaadeldakse kasvu ja arengut viljastamisest kuni varase noorlooma arengujärguni. Katsega (mis tavaliselt kestab 16 nädalat) hinnatakse kulleste varast arengut, moonet, ellujäämust, kasvu ja osalist suguküpsemist. Samuti võimaldab see mõõta mitmeid muid näitajaid, mille abil saab diagnostiliselt hinnata võimalikke endokriinfunktsiooni kahjustavaid kemikaale või muid arengu- ja reproduktiivtoksilisi aineid. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud meetod põhineb kannuskonnaga (*Xenopus laevis*) tehtud valideerimisuuringul, mille viis läbi Ameerika Ühendriikide Keskkonnakaitseamet ja mida toetavaid uuringuid on tehtud Jaapanis (1). Kuigi kasvu ja arengu jälgimise katse metoodika jaoks, mille oluline komponent on geneetilise soo kindlakstegemise võimalus, võivad sobida ka muud kahepaikseliigid, on käesolevas katsemeetodis kirjeldatud konkreetsed meetodid ja vaadeldavad näitajad kohaldatavad üksnes *Xenopus laevis'*e suhtes.

2. LAGDA on kahepaiksega tehtav kõrgema taseme katse, mille eesmärk on koguda kahjuliku toime kohta kontsentratsiooni-toime seost kirjeldavat põhjalikumat teavet, mida saaks kasutada ohtude väljaselgitamiseks ja kirjeldamiseks ning ökoloogilise riski hindamiseks. Katse vastab endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku 4. tasemele, kus *in vivo* katsetega kogutakse andmeid ka kahjuliku mõju kohta endokriinfunktsiooniga seotud näitajatele (2). Katse üldpõhimõtte kohaselt viiakse *X. laevis'*e embrüod, mis on Nieuwkoopi ja Faberi (NF) järgi 8.–10. staadiumis (3), kokkupuutesse uuritava kemikaali vähemalt nelja eri kontsentratsiooniga (mis üldjuhul erinevad üksteisest vähemalt poole logaritmintervalli võrra) ja kontrollaine(te)ga. Kokkupuudet jätkatakse 10. nädalani pärast kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega ning 62. staadiumis (≤ 45 päeva pärast viljastamist; tavaliselt 45. viljastamisjärgse päeva paiku) võetakse üks osaline vaheproov. Iga uuritava kontsentratsiooni juures tehakse neli paralleelproovi ja kontrollainega kaheksa paralleelproovi. Kokkupuute jooksul hinnatakse (osalise vaheprooviga ja katse lõpus võetava prooviga) nii üldise mürgisusega seotud näitajaid (suremus, ebatavaline käitumine ning kasvu ja kehamassi juurdekasv) kui ka näitajaid, millega kirjeldatakse konkreetselt endokriinsüsteemi kahjustavaid toimemehhanisme, mis mõjutavad östrogeenide, androgeenide või kilpnäärme vahendusel toimivaid füsioloogilisi protsesse. Meetodis keskendutakse eelkõige võimalikule populatsiooni mõjutavale toimele (kahjulik mõju ellujäämusele, arengule, kasvule ja sigimisvõime arengule), et arvutada täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) või toimet avaldav kontsentratsioon, mis põhjustab mõõdetava näitaja muutumise × protsendi võrra (ECx). Samas tuleb arvestada, et ECx-il põhinevad meetodid ei sobi sageli sellist tüüpi suurte uuringute jaoks, kus uuritavate kontsentratsioonide arvu suurendamine ECx-i kindlakstegemise eesmärgil võib olla ebaotstarbekas. Samuti tuleb tähele panna, et meetod ei hõlma sigimisetappi ennast. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

3. Kuna uuritud kemikaalide arv on väike ja kõnealuse üsna keeruka katse valideerimises osales vähe laboreid, ei ole laboritevahelist korratavust seni katseandmetega dokumenteeritud ning võib eeldada, et OECD katsejuhend

▼M8

nr 241 vaadatakse läbi ja seda muudetakse saadud kogemuste valguses pärast seda, kui on tehtud piisavalt uuringuid kõnealuse uue uuringukava toimivuse kinnitamiseks. LAGDA on oluline katse, mis aitab hinnata kahepaiksete populatsiooni vähenemise võimalikke mõjutegureid, kuna selles hinnatakse kemikaalidega kokkupuute mõju tundlikus kullesestaadiumis, kus kemikaalide kahjulik mõju ellujäämusele ja arengule, sealhulgas suguorganite normaalsele arengule, võib üle kanduda populatsioonile.

4. Katse on üles ehitatud nii, et sellega saaks tuvastada nii endokriinfunktsiooni kui ka muude mehhanismide kaudu tekkivat lõppmõju, ning osa selle diagnostilisi näitajaid on spetsiifilised põhiliste endokriinsüsteemi toimemehhanismide suhtes. Tuleb märkida, et enne LAGDA väljatöötamist puudus kirjeldatud ülesannet täitev valideeritud katsemeetod kahepaiksete jaoks.

5. Enne katse alustamist on oluline koguda andmeid uuritava kemikaali füüsikalis-keemiliste omaduste kohta, eelkõige selleks, et oleks võimalik valmistada püsivaid kemikaalilahuseid. Samuti tuleb kasutada piisavalt tundlikku analüüsimeetodit uuritava kemikaali kontsentratsioonide kontrollimiseks. Ligikaudu 16 nädalat kestva katse jaoks läheb vaja kokku 480 looma ehk *X. laevis'*e embrüot (lahusti kontrollproovi kasutamisel 640 embrüot), et tagada populatsiooniga seotud näitajate (nt kasv, areng ja suguküpsus) hindamiseks piisav statistiline võimsus.

6. Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks regulatiivsel eesmärgil tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused. Peale selle ei saa käesoleva katsemeetodiga hinnata otseselt sigivust ning järelikult see ei pruugi olla kasutatav kõrgemal tasemel kui endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku 4. tase.

KATSEMEETODI TEADUSLIK ALUS

7. Suur osa meie praegustest teadmistest kahepaiksete bioloogia kohta on saadud tänu kannuskonna (*Xenopus laevis*) kasutamisele laboratoorse mudelliigina. Seda liiki on laboris lihtne kasvatada, sellel ovulatsiooni esilekutsumiseks sobib inimese kooriongonadotropiin (hCG) ning loomavarud on hõlpsasti kättesaadavad kaubanduslikel eesmärkidel kasvatajatelt.

8. Sarnaselt kõikide selgroogsetega reguleerib kahepaiksete sigimisfunktsiooni hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) telg (4). Östrogeenid ja androgeenid täidavad selles endokriinsüsteemis vahendaja rolli ning juhivad sooliselt dimorfsete kudede arengut ja füsioloogiat. Kahepaiksete elutsüklis on kolm selgesti eristatavat etappi, mille vältel kõnealune telg on eriti aktiivne: 1) sugunäärmete diferentseerumine kullese arengu käigus, 2) teiseste sootunnuste kujunemine ja sugunäärmete küpsemine noorlooma staadiumis ning 3) täiskasvanud loomade sigimine. Vastuvõtlikkus endokriinfunktsiooni häiretele, mida põhjustavad teatavad kemikaalid (nt östrogeenid ja androgeenid) ning mis võib lõpuks viia organismide sigimisvõime kadumiseni, on kõigis nimetatud arenguetappides tõenäoliselt suurem.

9. Sugunäärmete areng algab NFi järgi 43. staadiumis, mil tekib bipotentsiaalne genitaalkurd. Sugunäärmete diferentseerumine algab NFi järgi 52. staadiumis, mil sugurakkude eellasrakud liiguvad säsikoesse (isastel) või jäävad arenevate sugunäärmete koorepiirkonda (emastel) (3). Asjaolust, et kõnealune sugunäärmete

▼M8

soolise diferentseerumise protsess on *Xenopus'*e puhul keemiliselt mõjutatav, teatati esimest korda 1950ndatel aastatel (5, 6). Kui kullesed puutuvad sugunäärmete diferentseerumise perioodil kokku östradiooliga, toimub isastel soo arengu pöördumine ning neist saavad täiskasvanuna kõigi toimivate funktsioonidega emased (7, 8). Võimalik on ka soo arengufunktsionaalne pöördumine emasest isaseks, mida on esile kutsutud kullestesse munandikoe siirdamisega (9). Ent kui liigil *Xenopus tropicalis* kutsub kokkupuude aromataasi inhibiitoriga esile soo arengu funktsionaalse pöördumise (10), siis *Xenopus laevis'*e puhul ei ole katsed seda kinnitanud. Varasemates katsetes on mürgiste ainete mõju sugunäärmete diferentseerumisele hinnatud moondeetapil tehtavate sugunäärmekoe uuringutega ja soo arengu pöördumist oli võimalik kindlaks teha üksnes soolise jaotumise analüüsi abil. Kuni viimase ajani puudus võimalus *Xenopus'*e geneetilise soo kindlakstegemiseks. Ent hiljutine *X. laevis'*e sooga seotud markerite avastamine annab võimaluse teha kindlaks geneetilist sugu ja tuvastada vahetult loomad, kellel soo areng on pöördunud (11).

10. Isastel noorloomadel jätkub areng vere testosteroonisisalduse kasvuga, millega kaasneb teiseste sootunnuste kujunemine ja munandite areng. Emastel loomadel toodavad munasarjad östradiooli ning selle tagajärjel ilmub nende plasmasse vitellogeniin (VTG), munasarjades tekivad vitellogeniini toimel ootsüüdid ja arenevad munajuhad (12). Munajuhad on emase teisesed sootunnused, mis aitavad sigimise käigus ootsüütidel küpseda. Munajuha läbivatele ootsüütidele tekib kallerkest ning need kogunevad emakasse ja on siis valmis viljastamiseks. Munajuhade arengut näivad reguleerivat östrogeenid, kuna nende kujunemine on *X. laevis'*e (13) ja *X. tropicalis'*e (12) puhul korrelatsioonis vere östradioolisisaldusega. Teatatud on munajuhade kujunemisest isastel, mida on põhjustanud kokkupuude polüklooritud bifenüüli ühenditega (14) ja 4-*tert*-oktüülfenooliga (15).

KATSE PÕHIMÕTE

11. Katsekava kohaselt viiakse NFi järgi 8.–10. staadiumis olevad *X. laevis'*e embrüod vee kaudu kokkupuutesse uuritava kemikaaliga neljas eri kontsentratsioonis, samuti kontrollproovi(de)ga. Kokkupuudet jätkatakse 10. nädalani pärast kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega ning 62. staadiumis võetakse üks vaheproov. Kui kemikaalid on väga hüdrofoobsed, võib olla võimalik neid manustada söödaga, kuid seda kokkupuute tekitamise viisi ei ole käesoleva katsemeetodi rakendamisel seni kuigi palju kasutatud. Iga uuritava kontsentratsiooniga tehakse neli paralleelkatset ja iga kontrollprooviga kaheksa paralleelkatset. Kokkupuute jooksul hinnatakse nii üldise mürgisusega seotud lõppnäitajaid (suremus, kõrvalekalded käitumises ning kasvu ja kehamassi juurdekasv) kui ka lõppnäitajaid (nt kilpnäärme histopatoloogia, sugunäärme ja -juhade histopatoloogia, väärarengud, plasma vitellgoeniinisisaldus (valikuline) ning genotüübiline/fenotüübiline sooline jaotumine), millega kirjeldatakse konkreetselt endokriinsüsteemi kahjustavaid toimemehhanisme, mis mõjutavad östrogeenide, androgeenide või kilpnäärme vahendusel toimivaid füsioloogilisi protsesse.

KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITEERIUMID

12. Kehtivad järgmised katse nõuetekohasuse kriteeriumid.

— Lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu katse vältel olema ≥ 40 % küllastuskontsentratsioonist õhus.

▼**M8**

— Vee temperatuur peaks olema vahemikus 21 ± 1 °C ning temperatuuride erinevus paralleelproovide ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 1,0 °C.

— Katselahuse pH tuleks hoida vahemikus 6,5–8,5 ning paralleelproovide ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vaheline erinevus ei tohiks ületada 0,5.

— Tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud rahuldavalt hoida vahemikus ± 20 % mõõtmistulemuste keskväärtusest.

— Kokkupuuteperioodil esinenud suremus peaks olema kõikides kontrollrühmade paralleelproovides ≤ 20 %.

— Uuringu alustamiseks valitud kudu eluvõimelisus peaks olema ≥ 70 %.

— Kontrollrühmades NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kuluv mediaanaeg peaks olema ≤ 45 päeva.

— Katseorganismide keskmine mass NFi järgi 62. staadiumisse jõudmisel ja katse lõpetamisel peaks olema kontrollrühmades ja lahusti kontrollrühmades (kui neid kasutatakse) vastavalt 1,0 ± 0,2 g ja 11,5 ± 3 g.

13. Kuigi see ei ole nõuetekohasuse kriteerium, soovitatakse analüüsil kasutada vähemalt kolme töötlemiskontsentratsiooni kolme rikkumata paralleelprooviga. Töödeldud rühma näitajaid rikkuvaks liigseks suremuseks peetakse kahes või enamas paralleelproovis esinevat rohkem kui nelja surmajuhtu (> 20 %), mis ei saa olla tingitud tehnilisest veast. Analüüsiks peaks olema võimalik kasutada vähemalt kolme töötlemiskontsentratsiooni, mille puhul ei ilmne selget mürgisust. Selge mürgisuse tunnused on muu hulgas katseorganismi hõljumine pinnal, lebamine nõu põhjas, ümberpööratud asendis või ebakorrapärane ujumine, pinnale mittetõusmine, ärritajatele mittereageerimine, morfoloogilised kõrvalekalded (*nt* jäsemedeformatsioonid), veritsevad haavandid ja kõhuturse.

14. Kui leitakse kõrvalekaldeid katse nõuetekohasuse kriteeriumidest, tuleks kaaluda selliste kõrvalekallete mõju katsetulemuste usaldusväärsusele ning esitada need kõrvalekalded ja kaalutlused katseprotokollis.

MEETODITE KIRJELDUS

Seadmed

15. Tavapärased laboriseadmed, eeskätt järgmised seadmed:

a) temperatuuri reguleerimise seade (nt kütteseadmed või jahutid, mis on reguleeritavad temperatuurile 21 ± 1 °C);

▼M8

b) termomeeter;

c) stereomikroskoop ja lahkamiseks vajalikud vahendid;

d) mikroskoobiga ühendatav digifotoaparaat vähemalt 4-megapikslise lahutusvõimega (vajadusel);

e) analüütiline kaal, millega on võimalik kaaluda 0,001 mg või 1 µg täpsusega;

f) lahustunud hapniku mõõtur ja pH-meeter;

g) valgustustiheduse mõõtur, mis näitab tulemust luksides.

Vesi

Päritolu ja kvaliteet

16. Kasutada võib kohapeal kättesaadavat lahjendusvett (nt allikavesi või aktiivsöega filtreeritud kraanivesi), mis võimaldab *X. laevis'*e normaalset kasvu ja arengut, ning olemas peavad olema tõendid selles vees aset leidva normaalse kasvu kohta. Kuna kohaliku vee kvaliteet võib olenevalt asukohast oluliselt erineda, tuleb teha vee kvaliteedi analüüs, eriti juhul, kui puuduvad varasemad andmed selle vee kasutamise kohta kulleste kasvatamiseks. Raskemetallide (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (nt Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pestitsiidide, orgaanilise süsiniku ja hõljuvaine sisaldus tuleks kindlaks teha enne katse algust ja/või kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, siis näiteks iga kuue kuu järel. Mõned nõuetekohase lahjendusvee keemilised omadused on esitatud 2. liites.

Jodiidi kontsentratsioon katses kasutatavas vees

17. Selleks et kilpnääre saaks sünteesida normaalset moonet toetavaid kilpnäärmehormoone, peab kullestele olema vee ja sööda kaudu kättesaadav piisav kogus jodiidi. Praegu ei ole empiirilisi suuniseid söödas või vees sisalduva jodiidi minimaalse kontsentratsiooni kohta, mis on vajalik normaalse arengu tagamiseks. Siiski võib jodiidi kättesaadavus mõjutada kilpnäärmesüsteemi reageerimisvõimet kilpnääret aktiveerivatele ainetele ja on teada, et see mõjutab kilpnäärme baasaktiivsust, millele tasub tähelepanu pöörata kilpnäärme histopatoloogilise uuringu tulemuste tõlgendamisel. Varasemate uurimuste põhjal on katse edukalt läbi viidud, kui jodiidi (I⁻) kontsentratsioon lahjendusvees on olnud vahemikus 0,5–10 µg/l. Ideaaljuhul peaks jodiidi kontsentratsioon lahjendusvees olema kogu katse vältel 0,5 µg/l (seda lisatakse veele naatrium- või kaaliumsoola kujul). Kui katses kasutatav vesi saadakse deioniseeritud veest kunstlikult, tuleks sellele lisada jodiidi kontsentratsioonis vähemalt 0,5 µg/l. Katseprotokollis tuleks registreerida katses kasutatud vees (lahjendusvees) mõõdetud jodiidikontsentratsioonid ning joodi või muude soolade lisamine katsevette (kui neid kasutatakse). Lisaks veele võib mõõta ka sööda joodisisaldust.

Kokkupuutesüsteem

18. Katse väljatöötamisel kasutati läbivooluga lahjendussüsteemi. Süsteemi kõik veega kokkupuutuvad osad peaksid olema klaasist, roostevabast terasest ja/või muust keemiliselt inertsest materjalist. Kokkupuutenõudeks peaksid olema klaasist või roostevabast terasest akvaariumid kasuliku ruumalaga vahemikus 4,0–10,0 l (veesügavusega vähemalt 10–15 cm). Süsteem peaks võimaldama kasutada kõiki kokkupuutekontsentratsioone, kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma (kui see on vajalik) nii, et iga kontsentratsiooniga töödeldavas rühmas on neli ja igas kontrollrühmas kaheksa paralleelproovi. Vooluhulk igas nõus peaks olema konstantne, nii et püsiksid bioloogilised tingimused ja säiliks kokkupuude kemikaaliga. Soovitatavalt peaks vooluhulk olema piisav (nt vähemalt viis nõu täielikku veevahetust päevas), et

▼M8

vältida kemikaali kontsentratsiooni vähenemist katseorganismide ja akvaariumis leiduvate veemikroobide ainevahetuse, abiootilise lagunemise (hüdrolüüs, fotolüüs) või kadude (aurustumine, sorptsioon) tagajärjel. Katsenõud tuleks kokkupuutesüsteemis kohtadele asetada juhuslikkuse alusel, et vähendada asukoha, sealhulgas temperatuuri, valgustugevuse ja muude väikeste erinevuste võimalikku mõju. Lisateavet läbivooluga kokkupuutesüsteemide koostamise kohta võib leida kalade, suurselgrootute ja kahepaiksetega tehtavaid ägeda mürgisuse katseid käsitlevast ASTMi standardjuhendist (16).

Kemikaali lisamine: katselahuste valmistamine

19. Katselahuste valmistamiseks kokkupuutesüsteemis tuleks uuritava kemikaali põhilahust manustada kokkupuutesüsteemi sobiva pumba või muu seadme abil. Põhilahuse vooluhulka tuleb enne kokkupuute alustamist kalibreerida vastavalt katselahustega tehtud analüüsi tulemustele, ning seda tuleb katse jooksul regulaarselt volumeetriliselt kontrollida. Katselahust tuleb igas nõus iga päev mahu järgi vähemalt viis korda uuendada.

20. Meetod, mida kasutatakse uuritava kemikaali lisamiseks süsteemi, sõltub kemikaali füüsikalis-keemilistest omadustest. Seetõttu tuleks enne katset koguda asjaomase kemikaali kohta lähteandmeid, et kontrollida selle sobivust katses kasutamiseks. Uuritava kemikaali kohta on kasulik teada selle struktuurivalemit, molekulmassi, puhtust, püsivust vees ja valguse käes, pK_a-d, K_{ow}-d, lahustuvust vees (soovitavalt selles, mida kasutatakse katses) ja aururõhku, samuti kiire biolagundatavuse katse tulemusi (katsemeetod C.4 (17) või C.29 (18)). Lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas katse ajal võib esineda uuritava kemikaali kadu aurustumise tõttu. Katset läbiviimist ilma eespool osutatud andmeteta tuleks hoolikalt kaaluda, sest uuringu kavandamisel tuleb arvesse võtta uuritava kemikaali füüsikalis-keemilisi omadusi ning ilma sellekohaste andmeteta võib katse tulemuste tõlgendamine osutuda raskeks või võimatuks. Uuritava kemikaali kvantitatiivseks määramiseks katselahustes peaks olemas olema usaldusväärne teadaoleva dokumenteeritud täpsuse ja avastamispiiriga analüüsimeetod. Vees lahustuvat uuritavat kemikaali võib lahustada lahjendusvee alikvootides kontsentratsioonis, mis võimaldab kemikaali lisada läbivoolusüsteemi kaudu vajalikus katsekontsentratsioonis. Toatemperatuuril vedelate või tahkete ja vees mõõdukalt lahustuvate kemikaalide puhul võib olla vajalik vedelikul või tahkel materjalil (*nt* klaasvill) põhinev küllastuskolonn (19). Väga hüdrofoobseid uuritavaid kemikaale võib olla võimalik manustada söödaga, kuid seda kokkupuuteviisi ei ole käesoleva katsemeetodi rakendamisel kuigi palju kasutatud.

21. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahjendusvees lihtsalt mehaaniliselt segada või loksutada (kasutades nt segurit ja/või ultrahelitöötlust). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne/-süsteeme või passiivse doseerimise meetodeid (20). Eelistatavalt tuleks kasutada ilma kaaslahustita katsesüsteemi, kuid kuna uuritavatel kemikaalidel on erinevad füüsikalis-keemilised omadused, tuleb kokkupuutevee valmistamisel tõenäoliselt kasutada erinevaid lähenemisviise. Lahustite ja kandeainete kasutamist tuleks kõigi vahenditega vältida, sest 1) teatavad lahustid võivad olla ise mürgised ja/või põhjustada

▼M8

soovimatuid või ootamatuid reaktsioone; 2) kemikaalide uurimine nende vees lahustuvusest kõrgemal kontsentratsioonil (nagu lahusteid kasutades sageli juhtub) võib raskendada toimet avaldava kontsentratsiooni täpset määramist; 3) lahustite kasutamine pikaajalistes katsetes võib põhjustada mikroobide tegevusega seotud märkimisväärset biokile moodustumist, mis võib mõjutada keskkonnatingimusi ja kokkupuutekontsentratsioonide säilitamise võimet ning 4) kui puuduvad varasemad andmed, mille kohaselt lahusti ei moonuta uuringu tulemust, tuleb lahusti kasutamiseks teha lahusti kontrollprooviga töötlemine, mis aga mõjutab oluliselt loomade heaolu, kuna katse jaoks on sel juhul vaja rohkem loomi. Raskesti uuritava kemikaali korral võib lahustit kasutada viimase võimalusena ning arvesse tuleb võtta OECD juhendit raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta (21), et teha kindlaks parim meetod. Lahusti valiku määravad uuritava kemikaali keemilised omadused ja olemasolevad varasemad kontrollandmed lahusti kasutamise kohta. Varasemate andmete puudumise korral tuleks lahusti sobivus kindlaks teha enne lõplikku uuringut. Kui lahusti kasutamine on vältimatu ja ilmneb mikroobne aktiivsus (biokile teke), on soovitatav biokile tekkimine igas nõus kogu katse jooksul (vähemalt kord nädalas) registreerida/protokollida. Ideaaljuhul peaks lahusti kontsentratsioon olema lahusti kontrollrühmas ja kõigis töödeldavates rühmades pidevalt ühtlane. Kui lahusti kontsentratsioon ei ole pidevalt ühtlane, tuleks lahusti kontrollrühmas kasutada töödeldavates rühmades kasutatavat suurimat lahusti kontsentratsiooni. Lahusti kandeaine kasutamise korral ei tohiks lahusti suurim kontsentratsioon ületada 100 µl/l või 100 mg/l (21) ja soovitatav on hoida lahusti kontsentratsioon võimalikult väike (nt ≤ 20 µl/l), et vältida lahusti võimalikku mõju mõõdetavatele näitajatele (22).

Katseloomad

Katseliik

22. Katseliik *X. laevis* on valitud järgmistel põhjustel: 1) seda kasvatatakse laborites kõikjal maailmas, 2) see on kaubanduses lihtsalt kättesaadav ning 3) sellel on võimalik kindlaks teha geneetilist sugu.

Täiskasvanute hooldus ja järglaste saamine

23. *X. laevis'*e nõuetekohast hooldust ja järglaste saamist on kirjeldatud standardjuhendis (23). *X. laevis'*e kasvatuskohta ja hooldamist on kirjeldanud ka Read (24). Sigimise esilekutsumiseks süstitakse kolmele kuni viiele täiskasvanud emas- ja isaslooma paarile kõhuõõnde inimese kooriongonadotropiini (hCG). Emas- ja isasisenditele süstitakse näiteks vastavalt ligikaudu 800–1 000 RÜd ja 500–800 RÜd hCG-d, mis on lahustatud 0,6–0,9 % füsioloogiliseks lahuses (või Ringeri lahuses, mis on kahepaiksetel kasutatav isotooniline füsioloogiline lahus). Süstemaht peaks olema ligikaudu 10 µl kehamassi grammi kohta (~1 000 µl). Sigimispaare hoitakse seejärel suurtes nõudes, häirimata ja püsivates tingimustes, et esile kutsuda kopulatsiooni. Igas sigimisnõus peaks olema roostevabast terasvõrgust topeltpõhi (nt võrguavadega 1,25 cm), millest munad kukuvad läbi nõu põhjale. Hilisel pärastlõunal hCG-ga süstitud konnad koevad enamiku mune järgmise päeva hommikupoolikul. Kui on koetud ja viljastatud piisav kogusmune, eemaldatakse täiskasvanud isendid sigimisnõust. Seejärel kogutakse munad kokku ja nende kallerkest eemaldatakse L-tsüsteiini abil (23). Selleks valmistatakse 2 % L-tsüsteiini lahus, mille pH viiakse 1 M NaOH abil väärtuseni 8,1. Saadud lahus temperatuuriga 21 °C lisatakse ühe kudu mune sisaldavasse 500 ml koonilisse kolbi, mida keerutatakse ettevaatlikult üks kuni kaks

▼M8

minutit. Seejärel loputatakse mune põhjalikult 6–8 korda 21 °C kasvatamisveega. Seejärel pannakse munad kristallisaatorisse ning kontrollitakse, kas nende eluvõimelisus on > 70 % ning alanud rakkude jagunemisega embrüote seas ei esine olulisel määral kõrvalekaldeid.

KATSEPLAAN

Uuritavad kontsentratsioonid

24. Soovitatav on kasutada vähemalt kemikaali nelja kontsentratsiooni ning lisaks sobivaid kontrollproove (sealhulgas lahusti kontrollproov, kui see on vajalik). Üldiselt soovitatakse, et kontsentratsioonide jada lahjendustegur ei oleks üle 3,2.

25. Käesoleva katsemeetodi puhul tuleks suurima uuritava kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võimaluste piires kasutada kahepaiksetega tehtud varasemate uuringute tulemusi, et vältida selgelt mürgiseid kontsentratsioone. Kõnealuse kontsentratsiooni kindlaksmääramisel võib kasutada näiteks kvantitatiivse struktuur-aktiivsussõltuvusest, analoogmeetoditest ja varasematest kahepaiksetega tehtud uuringutest saadavat teavet. Sellised uuringud on näiteks kahepaiksete metamorfoosi katse (katsemeetod C.38 (25)), konnaembrüo teratogeneesi katse – *Xenopus* (23) ja/või näiteks katsemeetodite C.48, C.41 ja C.49 kohaselt kaladega tehtud katsed (26–28). Enne LAGDAt võib läbi viia vahemiku leidmise katse. Soovitatavalt tuleks vahemiku leidmiseks kasutatavat kokkupuudet alustada 24 tunni jooksul pärast viljastamist ning see peaks kestma 7–14 päeva (vajadusel kauem). Uuritavad kontsentratsioonid valitakse nii, et nende vahe ei oleks suurem kui 10-kordne. Vahemiku leidmise katse tulemuste põhjal tuleks valida suurim LAGDAs kasutatav uuritav kontsentratsioon. Pange tähele, et kui on vaja kasutada lahustit, siis saab lahusti sobivuse (st kas see võib mõjutada uuringu tulemusi) samuti välja selgitada vahemiku leidmise katse osana.

Töödeldavate rühmade ja kontrollrühmade paralleelnõud

26. Iga uuritava kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada vähemalt nelja ja kontrollproovidega (sh vajadusel lahusti kontrollprooviga) vähemalt kaheksat paralleelnõud (st vajaliku statistilise võimsuse tagamiseks peaks katsenõude arv tavalises ja vajadusel lahusti kontrollrühmas olema kaks korda suurem kui igas töödeldavas rühmas). Ühes paralleelnõus olevate loomade arv ei tohiks olla suurem kui 20. Väikseim lubatud loomade arv on 15 (viis NFi järgi 62. staadiumis võetava osaproovi jaoks ja kümme noorlooma staadiumini kasvatamiseks). Ent igasse paralleelnõusse lisatakse täiendavaid loomi, et võimaliku suremuse korral ei langeks loomade arv alla 15 looma alampiiri.

KATSE KÄIK

Katse ülevaade

27. Katset alustatakse äsja koetud embrüotega (NFi järgi 8.–10 staadium) ja see kestab kuni noorlooma staadiumini. Iga päev kontrollitakse loomade suremust ja kõrvalekaldeid käitumises. NFi järgi 62. staadiumis võetakse kullestest osaproov (kuni 5 looma paralleelnõu kohta) ja mõõdetakse neil erinevaid näitajaid (tabel 1). Kui kõik loomad on jõudnud NFi järgi 66. staadiumisse, st läbinud moonde (või 70. päeval pärast katse alustamist, kui see saabub varem), vähendatakse juhuslikkuse alusel (aga ilma osaproovi võtmata) loomade arvu (10 loomani nõu kohta; vt punkt 43) ning alles jäänud

▼M8

loomadel jätkatakse kokkupuudet, kuni on möödunud veel 10 nädalat kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanajast alates. Katse lõpus (noorloomade proov) tehakse täiendavad mõõtmised (tabel 1).

Kokkupuutetingimused

28. Katse parameetrite täielik ülevaade on esitatud 3. liites. Kokkupuuteperioodil tuleks katselahustes iga päev mõõta lahustunud hapnikku, temperatuuri ja pH-d. Elektrijuhtivust, leelisust ja karedust mõõdetakse kord kuus. Katselahuse temperatuuride (päevasisene) erinevus paralleelnõude ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 1,0 °C. Samuti ei tohiks pH mõõtmisel paralleelnõude ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vaheline erinevus olla suurem kui 0,5.

29. Kokkupuutenõudest võib iga päev sifooni abil eemaldada alles jäänud sööda ja jäätmed, vältides sealjuures hoolikalt nõude ristsaastumist. Loomadele tuleb tekitada võimalikult vähe stressi ja traumasid, eriti nende ümbertõstmise ja käsitsemise ning akvaariumi puhastamise ajal. Vältida tuleb stressi tekitavaid tingimusi/tegevusi (nt vali ja/või lakkamatu müra, akvaariumidele koputamine, nõu vibratsioon).

Uuritava kemikaaliga kokkupuute kestus

30. Kokkupuutekatset alustatakse äsja koetud embrüotega (NFi järgi 8.–10. staadium) ning seda jätkatakse kümne nädala möödumiseni kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanajast (≤ 45 päeva alates katse algusest). Üldjuhul kestab LAGDA 16 nädalat (maksimaalselt 17 nädalat).

Katse alustamine

31. Katse alustamiseks tuleb valida sellised vanemloomad, kes on kontrollitult suutnud anda geneetiliselt kindlakstehtavast soost järglasi (5. liide). Kui täiskasvanud loomad on kudenud, kogutakse embrüod, millelt eemaldatakse tsüsteiiniga töötlemise teel kallerkest ja mille eluvõimelisust kontrollitakse (23). Tsüsteiiniga töötlemine võimaldab embrüoid kontrolli ajal käsitseda, ilma et need pindade külge kleepuksid. Kontroll tehakse stereomikroskoobi all ja eluvõimetud embrüod eemaldatakse sobiva suurusega pipeti abil. Eelistatult tuleks katses kasutada ühte kudu, milles eluvõimeliste embrüote osakaal on üle 70 %. NFi järgi 8.–10. staadiumis olevad embrüod jaotatakse juhuslikkuse alusel ettenähtud koguses lahjendusvett sisaldavate katsenõude vahel, kuni igas nõus on 20 embrüot. Embrüoid tuleks ümberpaigutamise ajal käsitseda ettevaatlikult, et vähendada sellest tingitud stressi ja vältida nende vigastamist. Kui viljastamisest on möödunud 96 tundi, peaksid kullesed olema veesambas ülespoole liikunud ja hakanud kinnituma nõu külgedele.

Söötmisrežiim

32. Sööt ja söödaratsiooni muutmine *X. laevis'*e eri arengustaadiumides on LAGDA metoodika puhul väga oluline. Kulleste ülesöötmine suurendab tavaliselt skolioosi esinemissagedust ja raskusastet (8. liide) ning sellest tuleks hoiduda. Teisalt põhjustab kulleste alasöötmine kontrollrühmas väga suuri erinevusi loomade arengu kiiruses, mis võib vähendada katse tulemuste

▼M8

statistilist võimsust või selgust. Läbivoolusüsteemides kasutatavat *X. laevis'*e kulleste ja noorloomade sööta ja söötmisrežiimi käsitlevad soovitused on esitatud 4. liites, kuid tingimusel, et katseorganismide kasv ja areng on rahuldav, on lubatud ka muud variandid. Oluline on arvestada, et kui mõõdetakse endokriinsüsteemiga seotud näitajaid, ei tohi sööt sisaldada endokriinsüsteemi mõjutavaid ained, näiteks sojajahu.

Kulleste söötmine

33. Kulleste puhul soovitatakse söödana kasutada kasvatamisvees (või lahjendusvees) kokku segatud forelli noorkalade sööda, *Spirulina* vetika tablettide ja kuldkala söödahelveste (*nt* helbed TetraFin®, Tetra, Saksamaa) segu. Kõnealust segu antakse kullestele tööpäevadel kolm korda päevas ja nädalavahetusel kord päevas. Lisaks söödetakse kulleseid alates kaheksandast viljastamisjärgsest päevast tööpäevadel kaks korda päevas ja nädalavahetustel üks kord päevas 24 tunni vanuste elusate soolavähivastsetega (*Artemia* spp.). Kulleste söödaratsioon peaks olema igas katsenõus ühesugune ning võimaldama katse tulemuste korratavuse ja ülekantavuse tagamiseks katseloomade piisavat kasvu ja arengut: 1) NFi järgi 62. staadiumisse jõudmise mediaanaeg kontrollrühmas peaks olema ≤ 45 päeva ja 2) kontrollrühma loomade keskmine kehamass 62. staadiumis peaks olema 1,0 ± 0,2 g.

Noorloomade söötmine

34. Pärast moonet tuleks söötmisrežiimis kasutada kvaliteetset uppuvat konnasööta, nt Sinking Frog Food 3/32 (Xenopus Express, FL, Ameerika Ühendriigid) (4. liide). Kui noorkonnad on veel väikesed, jahvatatakse graanuleid põgusalt kohviveskis, blenderis või peenestatakse uhmris, et vähendada nende suurust. Kui noorloomad on piisavalt suured täismõõdus graanulite söömiseks, ei ole jahvatamine või peenestamine enam vajalik. Loomi tuleks sööta kord päevas. Noorloomade söötmine peaks võimaldama organismide piisavat kasvu ja arengut: soovitatavalt peaks noorloomade keskmine kehamass kontrollrühmas katse lõpetamise ajaks olema 11,5 ± 3 g.

Analüütiline keemia

35. Enne katse alustamist tuleb hinnata uuritava kemikaali püsivust (nt lahustuvust, lagundatavust ja lenduvust) ning kõik vajalikud analüüsimeetodid tuleb valida olemasolevate andmete või teadmiste põhjal. Kui kemikaali annustatakse lahjendusveega, on soovitav enne katse algust analüüsida kõikidest paralleelnõudest võetud uuritavaid lahuseid, et kontrollida süsteemi toimivist. Kokkupuuteperioodil määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid sobivate ajavahemike järel, eelistatavalt igal nädalal iga töödeldava rühma vähemalt ühes paralleelnõus, jälgides, et eri nädalatel kasutataks sama töödeldava rühma erinevaid paralleelnõusid. Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Ent kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud kogu katse jooksul säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % nimikontsentratsioonist, võivad tulemused põhineda kas nimi- või mõõdetud väärtustel. Lisaks ei tohi ühegi töödeldava rühma sees mõõdetud katsekontsentratsioonide variatsioonikoefitsient kogu katse vältel ühegi kontsentratsiooni puhul ületada 20 % Kui mõõdetud kontsentratsioonid ei jää nimikontsentratsiooniga võrreldes vahemikku 80–120 % (nt kui uuritakse tugevalt biolagunevaid või adsorbeeruvaid kemikaale), tuleb määrata toimet avaldavad kontsentratsioonid ning esitada need suhtarvuna läbivoolukatsete kontsentratsioonide aritmeetilise keskmise suhtes.

▼M8

36. Lahjendusvee ja põhilahuse vooluhulkasid tuleb kontrollida sobivate ajavahemike järel (nt kolm korda nädalas) kogu kokkupuuteperioodi vältel. Kui kasutatakse kemikaale, mille esinemist ei ole võimalik mõne või ühegi nimikontsentratsiooni juures tuvastada (nt seepärast, et nad lagunevad kiiresti või adsorbeeruvad katsenõule või akumuleeruvad suurel määral katseloomade kehasse), soovitatakse kõikides kambrites katselahuse uuendamise sagedust kohandada nii, et uuritavad kontsentratsioonid püsiksid võimalikult ühtlased.

Vaatlused ja näitajate mõõtmine

37. Kokkupuute käigus hinnatakse nii mürgisusele osutavaid näitajaid (sh suremus, ebatavaline käitumine, näiteks kliinilised haiguse ja/või üldised mürgisuse sümptomid ning pikkusel ja kehamassil põhinevad kasvunäitajad) kui ka patoloogilisi näitajaid, mis võivad reageerida nii üldisele mürgisusele kui ka östrogeenide, androgeenide või kilpnäärme kaudu mõjuvatele endokriinsetele toimemehhanismidele. Lisaks võib katse lõpetamisel mõõta plasma VTG kontsentratsiooni. VTG mõõtmine võib aidata mõista uuringu tulemusi endokriinsete mehhanismide valguses, kui uuritakse võimalikke endokriinfunktsiooni kahjustavaid kemikaale. Tabelis 1 on esitatud ülevaade mõõdetavatest näitajatest ja mõõtmisaegadest.

Tabel 1

Ülevaade LAGDA näitajatest

Näitajad (*)	Iga päev	Vaheproov (kulleste proov)	Katse lõpetamisel (noorkonnade proov)
Suremus ja kõrvalekalded	X		
NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg		X	
Histo(pato)loogia (kilpnääre)		X	
Morfoloogia (kehamassi ja pikkuse juurdekasv)		X	X
Maksa somaatiline indeks (LSI)			X
Geneetiline/fenotüübiline sooline jaotumine			X
Histopatoloogia (sugunäärmed, sugujuhad, neerud ja maks)			X
Vitellogeniin (VTG) (valikuline)			X

(*) Kõiki näitajaid analüüsitakse statistiliselt.

Suremus ja igapäevased vaatlused

38. Kõiki katsenõusid tuleb iga päev kontrollida surnud loomade suhtes ja iga nõu puhul tuvastatud suremus registreeritakse. Surnud loomad tuleks katsenõust eemaldada kohe, kui neid märgatakse. Surnud loomad liigitatakse arengustaadiumi põhjal (NFi järgi) järgmistesse rühmadesse: enne 58. staadiumit (esijäsemete moodustumist), 58.–62. staadium, 63.–66. staadium (62. staadiumi ja saba täieliku resorbeerumise vahel), pärast 66. staadiumit (kullesejärgne staadium). Suremuse määr üle 20 % võib osutada sobimatutele katsetingimustele või uuritava kemikaali selgele mürgisusele. Loomade

▼M8

suremine kemikaalist sõltumatutel põhjustel on kõige tõenäolisem esimestel arengupäevadel pärast kudemist ja moonde haripunkti ajal. Taolistel põhjustel tekkinud suremust võib olla võimalik tuvastada kontrollrühma andmete põhjal.

39. Lisaks tuleks registreerida igasugune täheldatud ebatavaline käitumine, selgelt nähtavad väärarendid (nt skolioos) ja haavandid. Vaadeldud skolioosijuhud tuleks loendada (esinemissagedus) ja neile tuleks määrata raskusaste (nt ebaoluline – NR, kerge – 1, mõõdukas – 2, raske – 3; 8. liide). Mõõduka ja raske skolioosi esinemist tuleks püüda kogu uuringu vältel piirata (nt et see jääks kontrollrühmades alla 10 %), kuigi ka kontrollrühmades esinev suurem esinemissagedus ei ole tingimata põhjus katse katkestamiseks. Normaalse käitumisega kullesed hõljuvad veesambas, saba peast kõrgemal, sabauim peksleb korrapäraselt kindlas rütmis, nad tõusevad aeg-ajalt pinnale, nende lõpusekatted liiguvad ja nad reageerivad ärritajatele. Ebatavalise käitumise näideteks on pinnal hõljumine, nõu põhjas lebamine, kõht ülespidi või ebakorrapärane ujumine, pinnale mittetõusmine ja ärritajatele mitte reageerimine. Pärast moonet tuleks lisaks eespool nimetatud ebatavalisele käitumisele registreerida ka töödeldavate rühmade vahel esinevad suured erinevused sööda tarbimises. Olulisteks väärarenditeks ja kahjustusteks võivad muu hulgas olla morfoloogilised kõrvalekalded (nt deformeerunud jäsemed), veritsevad haavandid, kõhuturse, bakteri- või seennakkused. Noorkonnade peas vahetult sõõrmete taga esinevad haavandid võivad osutada ebapiisavale niiskustasemele. Kõnealused otsustused on kvalitatiivsed ja neid tuleks võrdluses kontrollrühma loomadega käsitada kui haiguse või stressi kliinilisi tunnuseid. Kui selliste tunnuste esinemissagedus on kokkupuutenõudes suurem kui kontrollnõudes, tuleks neid käsitada selge mürgisuse tunnustena.

Kulleste osaproov

Kulleste osaproovi kirjeldus

40. NFi järgi 62. staadiumisse jõudnud kullesed tuleks nõudest eemaldada ning kasutada neid proovi võtmiseks või viia nad kokkupuutekatse järgmiseks etapiks üle uude nõusse või eraldada nad vaheseinaga teistest samasse nõusse jäävatest kullestest. Kulleseid kontrollitakse iga päev ning iga kullese puhul registreeritakse uuringupäev, mil see jõuab NFi järgi 62. staadiumisse. Kõnealune hinnang antakse eelkõige peakuju põhjal. Isend tunnistatakse NFi järgi 62. staadiumisse jõudnuks siis, kui pea suurus on nii palju vähenenud, et selle laius on ligikaudu võrdne kullese kehatüve laiusega ja esijäsemed on kohakuti südame keskjoonega.

41. Eesmärk on võtta igast paralleelnõust prooviks viis NFi järgi 62. staadiumisse jõudnud kullest. Seda tuleks teha täiesti juhuslikult, aga juhusliku valiku numbrid peaksid olema eelnevalt otsustatud. **Joonisel 1** on esitatud paralleelnõu hüpoteetiline näidis. Kui nõus on elus kõik 20 kullest, tuleks selle nõu esimese isendi NFi järgi 62. staadiumisse jõudmise hetkel valida vahemikust 1–20 viis juhuslikku numbrit. Kulles nr 1 on isend, kes jõudis NFi järgi 62. staadiumisse esimesena, ja kulles nr 20 on isend, kes jõudis selles nõus 62. staadiumisse viimasena. Kui nõus on elus 18 kullest, siis valitakse viis juhuslikku numbrit sarnasel moel vahemikust 1–18. Seda tuleks teha iga paralleelnõu puhul siis, kui esimene kulles jõuab seal NFi järgi 62. staadiumisse. Kui NFi järgi 62. staadiumis olevatest kullestest proovide võtmise ajal esineb surmajuhtumeid, tuleb juhuslikku valikut korrata, lähtudes veel NFi järgi 62. staadiumi eelsesse olekusse jäänud kulleste arvust ja nõu kohta viie proovini jõudmiseks vajalike võtmata proovide arvust. Päeval, kui mõni kulles jõuab NFi järgi 62. staadiumisse, vaadatakse

▼M8

varem koostatud proovivõtutabelist, kas see kulles tuleb võtta proovi või eraldada kokkupuutekatse jätkamiseks füüsiliselt ülejäänud kullestest. Esitatud näites (joonisel 1) tuleb esimene NFi järgi 62. staadiumisse jõudnud isend (lahter 1) ülejäänud kullestest füüsiliselt eraldada ja jätta kemikaaliga kokkupuutesse; ühtlasi tuleb registreerida uuringupäev, millal isend NFi järgi 62. staadiumisse jõudis. Järgnevaid isendeid nr 2 ja nr 3 koheldakse samuti nagu esimest, aga isend nr 4 (selle konkreetse näite puhul) võetakse proovi, et mõõta juurdekasvu ja kilpnäärme histoloogiat. Sama toimingut korratakse kuni 20. isendi lisamiseni teistele NFi järgi 62. staadiumi järgses katseetapis olevatele isenditele või proovi võtmiseni. Kasutatav juhusliku valiku kord peab tagama igale katseorganismile ühesuguse tõenäosuse olla valitud. Selle saavutamiseks võib kasutada mis tahes juhusliku valiku meetodit, aga samas kehtib nõue, et iga kulles tuleb NFi järgi 62. staadiumi proovide võtmise perioodil mingil hetkel võrgu abil nõust välja tõsta.

Joonis 1

Hüpoteetiline näide NFi järgi 62. staadiumi proovivõturežiimi kohta ühe paralleelnõu puhul



42. Kulleste osaproovi võtmisel mõõdetakse järgmised näitajad: 1) NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg (st päevade arv viljastamisest 62. staadiumisse jõudmiseni), 2) välised väärarengud, 3) morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus) ning 4) kilpnäärme histoloogia.

Kulleste humaanne surmamine

43. Osaproovi võetud NFi järgi 62. staadiumis olevate kulleste (viis isendit paralleelnõu kohta) surmamiseks tuleks nad asetada 30 minutiks vajalikus koguses (nt 500 ml) anesteetikumilahusesse (nt trikaiinmetaansulfonaadi (MS-222, CASi nr 886-86-2) 0,3 % lahus). MS-222 lahust tuleks puhverdada naatriumvesinikkarbonaadiga kuni pH ligikaudse väärtuseni 7,0, sest puhverdamata MS-222 lahus on happeline, ärritab konnade nahka ning põhjustab halba imendumist ja tarbetut lisastressi organismidele.

44. Kullese eemaldamiseks katsenõust ja surmamislahusesse asetamiseks kasutatakse sõelvõrku. Loom on nõuetekohaselt surmatud ja lahanguks valmis siis, kui ta ei reageeri välistele ärritajatele (nt tagajäseme pigistamisele pintsettidega).

Morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus)

45. Iga kullese märgmassi (milligrammi täpsusega) ja pikkust ninamikust pärakuavani (0,1 mm täpsusega) tuleks mõõta kohe, kui kulles on anesteetikumi mõjul reaktsioonivõimetuks muutunud (joonis 2a). Pildianalüüsi tarkvara kasutades võib ninamiku ja pärakuava vahekaugust mõõta ka fotodelt. Liigse

▼M8

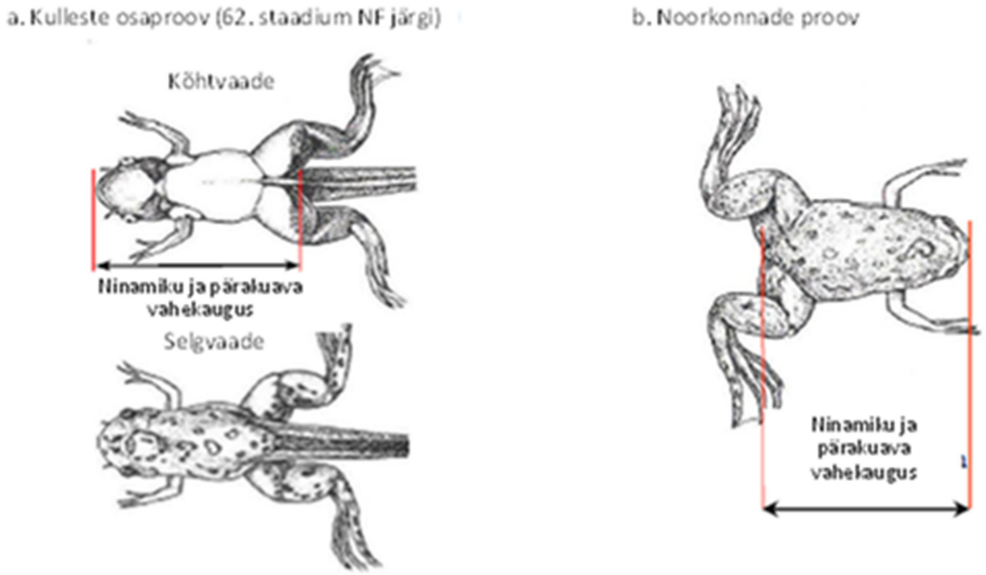
vee eemaldamiseks tuleks kullesed enne kaalumist kuivatuspaberiga kuivatada. Pärast kasvunäitajate (kehamass ning ninamiku ja pärakuava vahekaugus) mõõtmist tuleks registreerida (soovitavalt elektrooniliselt) või üles märkida tuvastatud suured morfoloogilised kõrvalekalded ja/või mürgisuse kliinilised tundemärgid, näiteks skolioos (vt 8. liide), petehhia ja verejooksud. Petehhia avaldub nahakapillaaride punaste või lillade täppverevalumitena.

Koeproovide võtmine ja fikseerimine

46. Kulleste osaproovi puhul kasutatakse histoloogiliseks analüüsiks kilpnääret. Alakeha lõigatakse esijäsemete tagant maha ja kõrvaldatakse. Lühendatud rümp fikseeritakse Davidsoni fikseerimislahuses. Fikseerimislahuse kogus nõus peaks olema vähemalt 10 korda suurem kui kudede ligikaudne ruumala. Fikseerimislahust tuleb huvi pakkuvate kudede nõuetekohaseks fikseerimiseks piisavalt loksutada või keerutada. Kõik koeproovid jäetakse Davidsoni fikseerimislahusesse vähemalt 48 tunniks, aga mitte rohkem kui 96 tunniks. Seejärel loputatakse neid deioniseeritud vees ja säilitatakse neutraalse puhvriga 10 % formaliini lahuses (1, 29).

Kilpnäärme histoloogia

47. Kõigil kulleseproovidel tehakse (pärast kudede fikseerimist) kilpnäärme histoloogiline analüüs: diagnoos ja raskusastme määramine (29, 30).



Joonis 2. LAGDAs kasutatavad ninamiku ja pärakuava vahekauguse mõõtmise punktid NFi järgi 62. staadiumis (a) ja noorkonnadel (b). NFi järgi 62. staadiumi (a) iseloomulikud tunnused: pea laius on võrdne kehatüve laiusega, haistmisnärvi pikkus on väiksem kui haistmissibula läbimõõt (selgvaates) ja esijäsemed on südamega samal joonel (kõhtvaates). Piltide allikas: Nieuwkoop ja Faber (1994).

Kulleste kokkupuute lõpetamine

48. Kulleste algset arvu arvestades võib eeldada, et väike osa isenditest ei arene normaalselt ega lõpeta moonet (NFi järgi 66. staadium) mõistliku aja jooksul. Kullesestaadiumis kasutatav kokkupuuteaeg ei tohiks ületada 70 päeva. Kõik

▼M8

selle perioodi lõpuks alles jäänud kullesed tuleks surmata (vt punkt 43) ning seejärel mõõta nende märgmass ning ninamiku ja pärakuava vahekaugus, kindlaks teha nende arengustaadium Nieuwkoopi ja Faberi (1994) järgi ning märkida üles nende väärarengud.

Praakimine NFi järgi 66. staadiumi järel

49. Alates NFi järgi 66. staadiumist (saba täielik resorbeerumine) tuleks kokkupuutekatse lõpuni alles jätta kümme isendit nõu kohta. Seega tuleks praakimine läbi viia siis, kui kõik loomad on jõudnud NFi järgi 66. staadiumisse, või 70 päeva möödumisel (olenevalt sellest, kumb on varasem). NFi järgi 66. staadiumi järel kokkupuutekatsest eemaldatavad loomad valitakse juhuslikult.

50. Loomad, kellega kokkupuutekatset ei jätkata, surmatakse (vt punkt 43). Igal loomal mõõdetakse arengustaadium, märgmass ning ninamiku ja pärakuava vahekaugus (joonis 2b), samuti tehakse üldine lahang. Fenotüübiliseks sooks (sugunäärme morfoloogia põhjal) märgitakse emane, isane või ebaselge.

Noorkonnade proov

Noorkonnade proovi kirjeldus

51. Alles jäänud loomad jäetakse kemikaaliga kokkupuutesse kümnenda nädalani pärast lahjendusvee (ja/või vajadusel lahusti) kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega. Kokkupuuteperioodi lõpuks alles jäänud loomad (kuni 10 konna paralleelnõu kohta) surmatakse, nende erinevaid näitajaid mõõdetakse või hinnatakse ning need registreeritakse: 1) morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus), 2) fenotüübiline/genotüübiline sooline jaotumine, 3) maksa mass (maksa somaatiline indeks), 4) histopatoloogia (sugunäärmed, sugujuhad, maks ja neerud) ning valikuliselt 5) plasma VTG-sisaldus.

Konnade humaanne surmamine

52. Moonde läbinud noorkonnad surmatakse anesteetikumi (nt sobiva fosfaadipuhvriga 10 % MS-222 lahus) süstimisega kõhuõõnde. Konnadelt proovide võtmist võib alustada pärast seda, kui nad ei reageeri enam ärritajatele (tavaliselt umbes kaks minutit pärast süsti, kui kasutatakse 10 % MS-222 lahust annuses 0,01 ml konna kehamassi grammi kohta). Kuigi noorkonnad võib panna ka suurema kontsentratsiooniga anesteetikumilahusesse (MS-222), on kogemused näidanud, et selle meetodi korral kulub nende tuimastamiseks rohkem aega ja see võib proovide võtmist raskendada. Süst tagab tõhusa ja kiire surmamise enne proovide võtmist. Proovide võtmist ei tohiks alustada enne, kui konnade reaktsioonivõime kadumist on kontrollitud veendumaks, et loomad on surnud. Kui konnadel ilmneb märkimisväärsete kannatuste tunnuseid (mis on väga raskekujulised ja konnade surm on usaldusväärselt prognoositav) ja nad on surmaeelses seisundis, tuleks nad tuimastada ja surmata ning arvestada nende andmetega suremuse analüüsimisel. Haigestunud konnade surmamise juhud tuleb üles märkida ja neid katseprotokollis kajastada. Olenevalt sellest, millisel uuringuetapil konn surmatakse, võidakse konna säilitada histopatoloogiliseks analüüsiks (konnade fikseerimine võimalikuks histopatoloogia uuringuks).

Morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus)

53. Märgmassi ning ninamiku ja pärakuava vahekaugust (joonis 2b) mõõdetakse samuti nagu kulleste osaproovi puhul.

▼M8

Plasma VTG -sisaldus (valikuline)

54. VTG on laialdaselt kasutatav biomarker, mis näitab kokkupuudet östrogeensete kemikaalidega. LAGDA puhul võib plasma VTG-sisaldust soovi korral mõõta noorkonnade proovides (eelkõige võib see olla vajalik juhul, kui uuritav kemikaal võib olla östrogeen).

55. Surmatud noorkonna tagajäsemed lõigatakse maha ja vereproov võetakse hepariniseeritud kapillaartoruga (aga sobida võib ka mõni muu vereproovi võtmise meetod, nt südame punktsioon). Veri lastakse mikrotsentrifuugianumase (nt mahuga 1,5 ml) ja seda tsentrifuugitakse plasma eraldamiseks. Plasmaproove tuleks hoida –70 °C juures või sellest madalamal temperatuuril kuni VTG määramiseni. VTG kontsentratsiooni plasmas saab mõõta ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodiga (6. liide) või mõne muu meetodi, näiteks massispektromeetria abil (31). Suurema tundlikkuse tõttu eelistatakse liigispetsiifiliste antikehade kasutamist.

Geneetilise soo määramine

56. Iga noorkonna geneetilist sugu hinnatakse Yoshimoto *et al.* (11) välja töötatud markerite põhjal. Geneetilise soo määramiseks eemaldatakse lahkamise ajal osaliselt (või tervikuna) üks tagajäse (või muu kude), mida säilitatakse mikrotsentrifuugianumas (konnade koeproove võib võtta mis tahes koest). Koeproove hoitakse –20 °C juures või sellest madalamal temperatuuril kuni desoksüribonukleiinhappe (DNA) eraldamiseni. Koest DNA eraldamiseks võib kasutada müügilolevaid komplekte ning markeri esinemise või puudumise analüüsiks kasutatakse polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodit (5. liide). Üldjuhul on histoloogilise ja genotüübilise soo kokkulangevus kontrollrühmade noorkonnade seas proovi võtmise hetkel üle 95 %.

Koeproovide võtmine ja fikseerimine histopatoloogilise analüüsi jaoks

57. Viimase proovivõtu ajal võetakse loomadelt histoloogilise analüüsi tegemiseks sugunäärmed, sugujuhad, neerud ja maksad. Kõhuõõs avatakse ning maks lõigatakse välja ja kaalutakse. Järgmiseks eemaldatakse alakõhust ettevaatlikult seedeorganid (nt magu, sooled), et paljastada sugunäärmed, neerud ja sugujuhad. Sugunäärmetel leitud suured morfoloogilised kõrvalekalded tuleb üles märkida. Lõpuks tuleb eemaldada tagajäsemed, kui neid ei ole vereproovi võtmiseks juba varem eemaldatud. Eemaldatud maksad ja *in situ* jäetud sugunäärmetega rümp tuleb kohe asetada Davidsoni fikseerimislahusesse. Fikseerimislahuse kogus nõus peaks olema vähemalt 10 korda suurem kui kudede ligikaudne ruumala. Kõik koeproovid jäetakse Davidsoni fikseerimislahusesse vähemalt 48 tunniks, aga mitte rohkem kui 96 tunniks. Seejärel loputatakse neid deioniseeritud vees ja säilitatakse neutraalse puhvriga 10 % formaliini lahuses (1, 29).

Histopatoloogiline analüüs

58. Kõiki noorkonnadelt võetud proove analüüsitakse histoloogiliselt, et leida sugunäärmete, sugujuhade, neerude ja maksakoe patoloogiaid, panna diagnoos ja määrata raskusaste (32). Hindamise käigus selgitatakse välja ka sugunäärmete (nt munajuhad, munandid, intersoolised organid) fenotüüp ning neid vaatlusandmeid saab koos isendi geneetilise soo mõõtmise andmetega kasutada fenotüübilise/genotüübilise soolise jaotumise arvutamiseks.

▼M8

ANDMED JA ARUANDLUS

Statistiline analüüs

59. LAGDAga saadakse kolme liiki andmeid, mida tuleb statistiliselt analüüsida: 1) kvantitatiivsed pidevandmed (kehamass, ninamiku ja pärakuava vahekaugus, maksa somaatiline indeks, VTG), 2) arengu kiirust näitavad sündmuseni kulunud aja andmed (päevade arv katse algusest kuni NFi järgi 62. staadiumini) ning 3) järjestusandmed, mis esitatakse histopatoloogilise analüüsi põhjal raskusastme või arengustaadiumi kujul.

60. Katseplaan ja valitud statistilised testid peaksid soovitatavalt tagama piisava statistilise võimsuse, et tuvastada näitajate bioloogiliselt olulisi muutusi katses, mille puhul tuleb esitada täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) või toimet avaldav kontsentratsioon (ECx). Andmete statistiline analüüs (üldjuhul paralleelproovide keskväärtuste põhjal) peaks eelistatavalt toimuma vastavalt meetoditele, mida on kirjeldatud OECD koostatud juhendis ökotoksilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsete meetodite rakendamise kohta (33). Käesoleva katsemeetodi 7. liites on esitatud soovitatav otsustusskeem statistilise analüüsimeetodi leidmiseks ja juhised andmete töötlemiseks ning LAGDA puhul sobivaima statistilise testi või mudeli valimiseks.

61. Kuna genotüübiline sugu tehakse kindlaks kõikide konnade puhul, tuleks noorkonnade proovi andmeid (nt kasv, maksa somaatiline indeks) analüüsida mõlema genotüübilise soo kohta eraldi.

Andmete analüüsiga seotud kaalutlused

Rikutud paralleelproovide ja töödeldud rühmade kasutamine

62. Paralleelproove ja töödeldud rühmasid võib rikkuda selgest mürgisusest, haigusest või tehnilisest veast tingitud liiga kõrge suremus. Kui mõni töödeldud rühm on haiguse või tehnilise vea tagajärjel rikutud, peaks analüüsiks alles jääma kolm rikkumata töödeldud rühma, milles on kolm rikkumata paralleelproovi. Kui suure kontsentratsiooniga töödeldavates rühmades esineb selge mürgisus, oleks analüüsiks eelistatavalt vaja vähemalt kolme eri kontsentratsioonidega töödeldavat rühma, milles on kolm rikkumata paralleelproovi (vastavalt OECD katsejuhendites esitatud maksimaalse talutava kontsentratsiooni põhimõttele (34)). Lisaks suremusele võib selge mürgisuse tunnuseks olla ka teatav käitumine (nt pinnal hõljumine, nõu põhjas lebamine, ümberpööratud asendis või ebakorrapärane ujumine), morfoloogiline kahjustus (nt veritsev haavand, kõhuturse) või normaalse toitumise pärsitus, mis ilmneb kvalitatiivses võrdluses kontrollrühma loomadega.

Lahusti kontrollrühm

63. Katse lõpetamisel tuleb hinnata lahusti (kui seda kasutatakse) võimalikku mõju. Seda tehakse lahusti kontrollrühma ja lahjendusvee kontrollrühma statistilise võrdlemisega. Kõnealuses analüüsis vaadeldavad kõige olulisemad näitajad on seotud kasvuga (kehamass ja pikkus), kuna neid võib mõjutada üldine mürgisus. Kui nende näitajate puhul tuvastatakse lahjendusvee kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi, tuleb parimatest erialateadmistest lähtudes hinnata, kas see ohustab katse nõuetekohasust. Kui kahe kontrollrühma näitajad erinevad, tuleks kemikaaliga kokku puutunud rühmi võrrelda lahusti kontrollrühmaga, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust lahjendusvee kontrollrühmaga. Kui kahe kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei ole, soovitatakse võrrelda uuritava kemikaaliga kokku puutunud rühmi mõlema kontrollrühma (lahusti ja lahjendusvesi) koondatud näitajatega, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust ainult lahjendusvee või ainult lahusti kontrollrühmaga.

▼M8

Katseprotokoll

64. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

Uuritav kemikaal:

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— Ühest koostisosast koosnev aine –

füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

— Mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest andmetest.

Katsealune liik:

— teaduslik nimetus, liin (kui on), päritolu ning viljastatud munade kogumise ja järgneva käitlemise meetod;

— skolioosi esinemissagedus kasutatud kasvandusloomade varasemates kontrollrühmades.

Katsetingimused:

— valgusrežiim(id);

— katseplaan (nt nõude suurus, materjal ja veesisaldus, katsenõude ja paralleelnõude arv, katsealuste organismide arv paralleelnõu kohta);

— põhilahuste valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada selle nimetus ja kontsentratsioon);

— uuritava kemikaali annustamismeetod (nt pump, lahjendussüsteem);

— meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja uuritavad nimikontsentratsioonid, määramispiir, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja standardhälbed ja nende arvutamise meetod ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali kontsentratsiooni tõelises lahuses;

— lahjendusvee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, jääk-kloori sisaldus (kui on mõõdetud), joodi üldsisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus (kui on mõõdetud), hõljuvaine sisaldus (kui on mõõdetud), katselahuse soolsus (kui on mõõdetud) ja kõik muud mõõdetud näitajad;

— uuritavad nimikontsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed;

— vee kvaliteet katsenõudes: pH, temperatuur (iga päev) ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;

▼M8

— üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus).

Tulemused:

— tõendid selle kohta, et nõuetekohasuse kriteeriumid on kontrollrühmades täidetud;

— järgmised andmed kontrollrühma (ja lahusti kasutamise korral lahusti kontrollrühma) ja töödeldud rühmade kohta: suremus ja täheldatud kõrvalekalded, NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg, kilpnäärme histoloogia (ainult kulleste proovis), kasv (kehamass ja pikkus), maksa somaatiline indeks (ainult noorkonnade proovis), geneetiline/fenotüübiline sooline jaotumine (ainult noorkonnade proovis), sugunäärmete, sugujuhade, neerude ja maksa histopatoloogilise analüüsi tulemused (ainult noorkonnade proovis) ja plasma VTG-sisaldus (ainult noorkonnade proovis, kui on mõõdetud);

— statistilise analüüsi ja andmetöötluse meetod (kasutatud statistiline test või mudel);

— täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) iga hinnatud näitaja puhul;

— vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) iga hinnatud näitaja puhul (tasemel $\alpha = 0{,}05$); vajaduse korral ECx iga hinnatud näitaja puhul koos usaldusvahemikuga (nt usaldusnivool 95 %) ja selle arvutamiseks kasutatud lähendatud mudeli graafik, kontsentratsiooni-vastuse kõvera tõus, regressioonimudeli võrrand ning mudeli hinnangulised parameetrid ja nende standardviga;

— kõik kõrvalekalded katsemeetodist ja nõuetekohasuse kriteeriumidest ning nende võimalik mõju katse tulemustele.

65. Näitajate mõõtmistulemuste kohta tuleb esitada keskväärtused ja nende standardhälbed (võimaluse korral nii paralleelrühmade kui ka kontsentratsioonide lõikes).

66. Kontrollrühmades NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg tuleks arvutada paralleelnõude mediaanväärtuste keskväärtusena ja esitada koos standardhälbega. Sarnaselt tuleks töödeldud rühmade puhul arvutada töödeldud rühma mediaanväärtus, mis esitatakse paralleelnõude mediaanväärtuste keskväärtusena koos standardhälbega.

KIRJANDUS

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013), *Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.*

(2) OECD (2012a), „Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 150, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(3) Nieuwkoop, P.D. ja Faber, J. (1994), *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas, W. ja Lutz, I. (2006), „Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters“, *Journal of Chromatography*, A 1 130, lk 16–27.

▼**M8**

(5) Chang, C., Witschi, E. (1956), „Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*“, *Journal of the Royal Society of Medicine,* nr 93, lk 140–144.

(6) Gallien, L. (1953), „Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage“, *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, nr 237, lk 1 565.

(7) Villalpando, I. ja Merchant-Larios, H. (1990), „Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles“, *International Journal of Developmental Biology*, nr 34, lk 281–285.

(8) Miyata, S., Koike, S. ja Kubo, T. (1999), „Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*“, *Zoological Science*, nr 16, lk 335–340.

(9) Mikamo, K. ja Witschi, E. (1963), „Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes“, *Genetics*, nr 48, lk 1 411.

(10) Olmstead, A.W., Kosian, P.A., Korte, J.J., Holcombe, G.W., Woodis, K. ja Degitz, S.J. (2009)a, „Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor“, *Aquatic Toxicology*, nr 91, lk 143–150.

(11) Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T. ja Ito, M. (2008), „A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, nr 105, lk 2 469–2 474.

(12) Olmstead, A.W., Korte, J.J., Woodis, K.K., Bennett, B.A., Ostazeski, S. ja Degitz, S.J. (2009)b, „Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*“, *General and Comparative Endocrinology*, nr 160, lk 117–123.

(13) Tobias, M.L., Tomasson, J. ja Kelley, D.B. (1998), „Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*“, *Journal of Neurobiology*, nr 37, lk 441–448.

(14) Qin, Z.F., Qin, X.F., Yang, L., Li, H.T., Zhao, X.R. ja Xu, X.B. (2007), „Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*“, *Aquatic Toxicology*, nr 84, lk 321–327.

(15) Porter, K.L., Olmstead, A.W., Kumsher, D.M., Dennis, W.E., Sprando, R.L., Holcombe, G.W., Korte, J.J., Lindberg-Livingston, A. ja Degitz, S.J. (2011), „Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure“, *Aquatic Toxicology*, nr 103, lk 159–169.

(16) ASTM (2002), „Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians“, ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine“.

(18) Käesoleva lisa peatükk C.29 „Kiire biolagundatavus – CO_2 suletud nõudes (vabaruumi katse)“.

(19) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. ja Hammermeister, D.E. (1999), „Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays“, *Chemosphere* nr 39, lk 539–551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P., McLachlan, M.S. (2012), „A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests“, *Chemosphere*, nr 86(6), lk 593–599.

(21) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 23. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(22) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J. ja Pickford, D.B. (2006), „Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review“ (ülevaade), *Aquatic Toxicology*, nr 76, lk 69–92.

(23) ASTM (2004), „Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX)“, ASTM E1439-98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read, B.T. (2005), *Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog Xenopus Laevis*, Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, Ühendkuningriik, 84 lk.

(25) Käesoleva lisa peatükk C.38 „Kahepaiksete metamorfoosi katse“.

(26) Käesoleva lisa peatükk C.48 „Lühiajaline kalade paljunemise katse“.

(27) Käesoleva lisa peatükk C.41 „Kalade sugulise arengu katse“.

(28) Käesoleva lisa peatükk C.49 „Ägeda mürgisuse katse kalaembrüotega“.

(29) OECD (2007), „Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 82, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(30) Grim, K.C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., Touart, L., Wolf, D.C. ja Tietge, J. (2009), „Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances“, *Toxicological Pathology*, nr 37, lk 415–424.

(31) Luna, L.G. ja Coady, K.(2014), „Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry“, *Analytical and Bioanalytical Techniques*, nr 5(3), lk 194.

(32) OECD (2015), „Guidance on histopathology techniques and evaluation“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 228, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(33) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 54, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

(34) Hutchinson, T.H., Bögi, C, Winter, M.J. ja Owens, J.W. (2009), „Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology“, *Aquatic Toxicology*, nr 91(3), lk 197–202.

▼M8

1. liide

MÕISTED

Lõppnäitaja: näitaja, mis iseloomustab mõju populatsiooni tasandil.

Kemikaal: aine või segu.

ELISA: ensüümimmuunsorptsioonanalüüs.

ECx: (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel on katseorganismidele avalduva mõju ulatus x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC50 on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

dpf: päeva pärast viljastamist.

Läbivoolukatse: katse, mille puhul katselahused voolavad kokkupuuteperioodi vältel pidevalt läbi katsesüsteemi.

HAS-telg: hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg.

IUPAC: Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Vähim täheldatud toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC): uuritava kemikaali väikseim uuritav kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju võrdluses kontrollprooviga. Kemikaal peaks kõigi LOEC-st suuremate kontsentratsioonide juures avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui LOEC juures. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas LOEC (ja sellest lähtuvalt ka NOEC) on valitud. Sellekohased juhised on esitatud 7. liites.

Letaalne mediaankontsentratsioon (LC50): uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures kemikaal on katse vältel hinnanguliselt letaalne 50 %-le katseorganismidest.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC): uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) toimet ja mis on LOEC-st vahetult madalam.

SMILES: lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB: tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

VTG: vitellogeniin on fosfolipoglükoproteiin, mis on munarebu valkude eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikide ovipaarsete liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

▼**M8**

Liide 2

MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED OMADUSED

Koostisosa	Kontsentratsiooni piirnorm
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Jääk-kloor	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

▼**M8**

3. liide

LAGDA KATSETINGIMUSED

1. Katseliik	*Xenopus laevis*
2. Katse tüüp	Pideva läbivooluga katse
3. Vee temperatuur	Nimitemperatuur on 21 °C. Keskmine temperatuur kogu katse vältel 21 ± 1°C (temperatuuride erinevus paralleelproovide ja töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 1,0°C).
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga), valgustihedus vee pinnal 600–2 000 lx (lm/m^2)
5. Valgusrežiim	12 tundi valgust, 12 tundi pimedust
6. Uuritava lahuse ruumala ja katsenõu	4–10 l (vee sügavus vähemalt 10–15 cm) Klaasist või roostevabast terasest nõu
7. Uuritavate lahuste uuendamine kogu ruumala ulatuses	Konstantne, nii et säiliksid nii bioloogilised tingimused kui ka kemikaaliga kokkupuude (nt lahuse uuendamine kogu ruumala ulatuses viis korda päevas).
8. Katseorganismide vanus katse alguses	Nieuwkoopi ja Faberi (NF) järgi 8.–10. staadium
9. Organismide arv paralleelnõu kohta	Kokkupuute alguses 20 looma (embrüot) paralleelnõu kohta ja alates NFi järgi 66. staadiumist kuni kokkupuute lõpetamiseni 10 looma (noorkonna) paralleelnõu kohta
10. Töödeldavate rühmade arv	Vähemalt neli uuritava kemikaaliga töödeldavat rühma ja vajalikud kontrollrühmad
11. Paralleelnõude arv töödeldavate rühma kohta	Neli paralleelnõud uuritava kemikaali ühe kontsentratsiooniga töödeldava rühma kohta ja kaheksa paralleelnõud kontrollrühma kohta
12. Organismide arv uuritava kontsentratsiooni kohta	Vähemalt 80 looma uuritava kemikaali ühe kontsentratsiooniga töödeldava rühma kohta ja vähemalt 160 paralleelset looma kontrollrühma kohta
13. Lahjendusvesi	*X. laevis'*e normaalset kasvu ja arengut võimaldav vesi (nt allikavesi või aktiivsöega filtreeritud kraanivesi)
14. Aereerimine	Ei ole nõutav, kuid nõude aereerimine võib osutuda vajalikuks juhul, kui lahustunud hapniku sisaldus langeb alla soovitatavat piirtaset ja uuritava lahuse vooluhulka ei saa enam suurendada.
15. Lahustunud hapniku sisaldus uuritavas lahuses	Lahustunud hapnik: ≥ 40 % küllastuskontsentratsioonist õhus või ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16. Uuritava lahuse pH	6,5–8,5 (erinevus paralleelproovide ja töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 0,5)
17. Katselahuse karedus ja leelisus	10–250 mg $CaCO_3$/l
18. Söötmisrežiim	(Vt 4. liide)
19. Kokkupuuteaeg	Alates NFi järgi 8.–10. staadiumist kümnenda nädalani pärast vee ja/või lahusti kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega (maksimaalselt 17 nädalat)
20. Bioloogilised näitajad	Suremus (ja välised kõrvalekalded), NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg (kulleste proovis), kilpnäärme histoloogia (kulleste proovis), kasv (kehamass ja pikkus), maksa somaatiline indeks (noorkonnade proovis), geneetiline/fenotüübiline sooline jaotumine (noorkonnade proovis), sugunäärmete, sugujuhade, neerude ja maksa histopatoloogilise analüüsi tulemused (noorkonnade proovis) ja plasma VTG-sisaldus (noorkonnade proovis, valikuline)
21. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid	Lahustunud hapniku sisaldus peaks olema > 40 % küllastuskontsentratsioonist õhus; keskmine veetemperatuur peaks olema vahemikus 21 ± 1 °C ning temperatuuride erinevus paralleelproovide ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vahel peaks olema < 1,0°C; uuritava lahuse pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5; suremus kontrollrühma igas paralleelnõus peaks olema ≤ 20 % ja NFi järgi 62. staadiumisse jõudmise keskmine aeg kontrollrühmas peaks olema ≤ 45 päeva; katseorganismide keskmine mass NFi järgi 62. staadiumisse jõudmisel ja katse lõpetamisel peaks olema kontrollrühmades ja lahusti kontrollrühmades (kui neid kasutatakse) vastavalt 1,0 ± 0,2 g ja 11,5 ± 3 g; tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus ± 20 % mõõdetud keskväärtusest.

▼**M8**

4. liide

SÖÖTMISREŽIIM

Kuigi käesoleva söötmisrežiimi kasutamine on soovitatav, on lubatud ka muud variandid tingimusel, et katseorganismid kasvavad ja arenevad piisava kiirusega.

Kulleste söötmine

Kulleste sööda ettevalmistamine

A. Forelli noorkalade sööt ja vetikad/TetraFin® (või samaväärne sööt) mahuvahekorras 1:1

1. Forelli noorkalade sööt: 50 g forelli noorkalade sööta (väikesed graanulid või pulber) segatakse blenderis suurel kiirusel 20 sekundi vältel 300 ml sobiva filtreeritud veega.

2. Vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu: 12 g spirulina vetika tablette segatakse blenderis suurel kiirusel 40 sekundi vältel 500 ml filtreeritud veega, 12 g Tetrafin®-i (või samaväärset sööta) segatakse 500 ml filtreeritud veega ning seejärel segud ühendatakse, et saada 1 l söödasegu, mis sisaldab 12 g/l spirulina vetikaid ja 12 g/l Tetrafin®-i (või samaväärset sööta).

3. Forelli noorkalade sööda segu ja vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu segatakse kokku võrdses mahuvahekorras.

B. Soolavähivastsed:

15 ml soolavähimarjal lastakse kooruda 1 l soolvees (selle valmistamiseks lisatakse 1 l deioniseeritud veele 20 ml NaCl). Pärast 24 tundi toatemperatuuril pideva valguse käes aereerimist korjatakse soolavähivastsed. Aereerimine peatatakse 30 minutiks, et soolavähivastsed saaksid põhja sadestuda. Nõu pinnal ujuvad tsüstid valatakse ära ja kõrvaldatakse ning soolavähivastses filtreeritakse sobivate filtritega ning neile lisatakse 30 ml filtreeritud vett.

Söötmisrežiim

Tabelis 1 esitatakse ülevaade kulleste kokkupuuteperioodil kasutatava sööda liigi ja koguse kohta. Loomi tuleks sööta esmaspäevast reedeni kolm korda päevas ja nädalavahetustel üks kord päevas.

Tabel 1.

*X. laevis'*e kulleste söötmisrežiim läbivoolusüsteemis.

Aeg (*) (pärast viljastamist)	Forelli noorkalade sööt: vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu		Soolavähivastsed	
	Tööpäeval (kolm korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)	Tööpäeval (kaks korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)
4.–14. päev (0–1. nädal)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (8.–15. päev) 1 ml (alates 16. päevast)	0,5 ml (8.–15. päev) 1 ml (alates 16. päevast)
2. nädal	0,67 ml	2,4 ml		
3. nädal	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. nädal	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. nädal	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Aeg (*) (pärast viljastamist)	Forelli noorkalade sööt: vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu		Soolavähivastsed	
	Tööpäeval (kolm korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)	Tööpäeval (kaks korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)
6. nädal	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. nädal	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8.–10. nädal	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Nullpäev on hCG süstimise päev.

Sööda muutmine üleminekul kullesest noorkonna staadiumisse

Pärast kulleste moonet hakatakse neid toitma noorkonnadele ette nähtud söödaseguga, mida on kirjeldatud allpool. Üleminekuperioodil tuleks kulleste söödasegu kogust järk-järgult vähendada ja noorkonnade sööda kogust suurendada. Selleks võib kullesesööda kogust proportsionaalselt vähendada ja noorkonnasööda kogust proportsionaalselt suurendada, võttes aluseks viieliikmelised kulleserühmad vastavalt sellele, kuidas nad läbivad NFi järgi 62. staadiumi ja lähenevad NFi järgi 66. staadiumis moonde lõpule.

Noorkonnade söötmine

Noorkonnade sööt

Kui moone on lõppenud (66. staadium) tuleks söötmisrežiimis täielikult üle minna 3/32-tollisele kvaliteetsele uppuvale konnasöödale (nt Xenopus Express™, FL, Ameerika Ühendriigid, või samaväärne sööt).

Graanulite peenestamine kullese noorkonnaks arenemise etapil

Uppuva konnasööda graanuleid jahvatatakse põgusalt kohviveskis, blenderis või peenestatakse uhmris, et vähendada nende suurust ligikaudu 1/3 võrra. Liiga pikalt töötlemine muudaks graanulid pulbriks ja seda ei soovitata.

Söötmisrežiim

Tabelis 2 esitatakse ülevaade noorkonna ja täiskasvanud konna staadiumis kasutatava sööda liigi ja koguse kohta. Loomi tuleks sööta kord päevas. Oluline on märkida, et moondeperioodil jätkatakse loomade söötmist soolavähivastsetega seni, kuni > 95 % loomadest on moonde läbinud.

Loomi ei tohiks sööta katse lõpetamise päeval, et sööt ei moonutaks kehamassi mõõtmise tulemusi.

Tabel 2.

***X. laevis*'e noorkonnade söötmisrežiim läbivoolusüsteemis. Tuleb arvestada, et moonde-eelses staadiumis loomad (k.a need, kelle moone kemikaaliga töötlemise tõttu hilineb) ei suuda süüa peenestamata graanuleid**

Aeg (*) (nädalat pärast moonde mediaanpäeva)	Peenestatud graanulid (mg noorkonna kohta)	Terved graanulid (mg noorkonna kohta)
Vastavalt moonde läbinud loomade arvule	25	0
0–1. nädal	25	28

▼**M8**

Aeg (*) (nädalat pärast moonde mediaanpäeva)	Peenestatud graanulid (mg noorkonna kohta)	Terved graanulid (mg noorkonna kohta)
2.–3. nädal	0	110
4.–5. nädal	0	165
6.–9. nädal	0	220

(*) Nullnädala esimene päev on kontrollrühma loomade moonde mediaanpäev.

▼M8

5. liide

GENEETILISE SOO MÄÄRAMINE

*Xenopus laevis'*e puhul kasutatav geneetilise soo määramise meetod põhineb Yoshimoto *et al.* (2008) esitatud kirjeldusel. Genotüübi määramise metoodika üksikasju saab vajaduse korral lugeda viidatud publikatsioonist. Kasutada võib ka muid sobivaks tunnistatud meetodeid (nt kõrge läbilaskevõimega qPCR).

X. laevis'e praimerid

DM-W marker

Otsepraimer: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Pöördpraimer: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positiivne kontroll

Otsepraimer: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Pöördpraimer: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNA puhastamine

DNA puhastamiseks lihas- või nahakoest kasutatakse näiteks verele ja kudedele ette nähtud Qiagen DNeasy komplekti (kat nr 69 506) või muud sarnast toodet vastavalt selle kasutusjuhendile. DNA voolutamisel segamiskolonnist võib kasutada vähem puhvrit, et saada suurema kontsentratsiooniga proove, kui seda peetakse PCRi jaoks vajalikuks. Pange tähele, et DNA on küllaltki püsiv ja seetõttu tuleks rakendada meetmeid, et vältida ristsaastumist, mis võib põhjustada isaste ekslikku emaseks pidamist või vastupidi.

PCR

*Tabelis 1*on esitatud ülevaade analüüsimetoodikast, milles kasutatakse Sigma toodetud ensüümi JumpStart™ *Taq*.

Tabel 1.

Sigma toodetud ensüümil JumpStart™ *Taq* põhinev analüüsimetoodika

Põhisegu	1x (µl)	[Lõplik]
NFW ([1261])	11	—
10x puhver	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP-d (igaüks 10 mM)	0,4	200 µM
Praimeri marker (8 µM)	0,8	0,3 µM
Pöördpraimeri marker (8 µM)	0,8	0,3 µM
Praimeri kontroll (8 µM)	0,8	0,3 µM
Pöördpraimeri kontroll (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 ühikut/µl
DNA matriits	1,0	~200 pg/µl

(*) Nukleaasivaba vesi
Märkus. Põhisegu tuleks valmistada varuga, et kompenseerida pipeti kasutamisel tekkivaid kadusid (näide: 24 reaktsiooni jaoks 25-kordne kogus).

▼**M8**

Reaktsioon:

Põhisegu	19,0 µl
Matriits	1,0 µl
Kokku	20,0 µl

Termotsükleri programm:

1. etapp	94°C	1 min
2. etapp	94°C	30 s
3. etapp	60°C	30 s
4. etapp	72°C	1 min
5. etapp	Tagasi 2. etappi.	35 tsüklit
6. etapp	72°C	1 min
7. etapp	4°C	hoida

Polümeraasi ahelreaktsiooni saadustega võib kohe teha analüüsi geelis või hoida neid 4°C juures.

Elektroforees agaroosgeeliga (3 %) (analüüsimetoodika)

50X TAE

Tris	24,2 g
Jää-äädikhape	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Lisada vett mahuni 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3: 1 agaroos

3 osa NuSieve™ GTG™ agaroosi

1 osa madala elektroendoosmoosiga Fisheri agaroosi

Meetod

1. Valmistada 3 % geel: 43 ml 1X TAE puhvrile lisada 1,2 g agaroosisegu. Keerutada segu suurte klompide eemaldamiseks.

2. Kuumutada agaroosisegu mikrolaineahjus kuni täieliku lahustumiseni (vältida ülekeemist). Lasta veidi jahtuda.

3. Lisada 1,0 µL etiidiumbromiidi (10 mg/ml). Keerutada kolbi. Etiidiumbromiid on mutageenne aine ning seetõttu tuleks kõnealusel etapil tehnilise võimaluse korral kasutada muid kemikaale, et vältida ohtu töötajate tervisele ([1]).

4. Valada geel kammi abil vormi. Lasta täielikult jahtuda.

([1]) Vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu 29. aprilli 2004. aasta direktiivi 2004/37/EÜ (töötajate kaitse kohta tööl kantserogeenide ja mutageenidega kokkupuutest tulenevate ohtude eest (kuues üksikdirektiiv nõukogu direktiivi 89/391/EMÜ artikli 16 lõike 1 tähenduses) (ELT L 158, 30.4.2004, lk 50)) artikli 4 lõikele 1.

▼**M8**

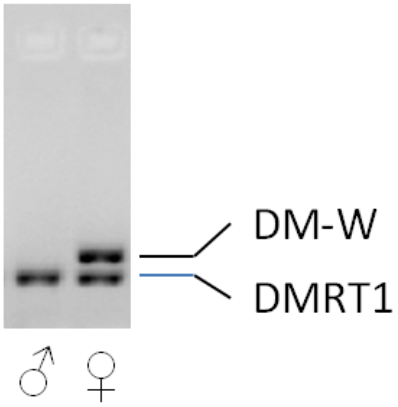
5. Lisada geel seadmesse. Katta geel 1X TAE puhvriga.

6. Lisada igale 10 µl PCRi produktile 1 µl 6x laadimisvärvi.

7. Kanda proovid pipetiga süvenditesse.

8. Rakendada ~20 minuti jooksul ühtlast 160 V pinget.

Joonisel 1 on kujutatud agaroosgeelipilti, millel on näha isas- ja emasisendite iseloomulikud ribamustrid.



Joonis 1. Agaroosgeelipilt, millel on näha isase (♂) isendi ribamuster (üks riba ~203 bp: DMRT1) ja emase (♀) isendi ribamuster (kaks riba ~259 bp: DM-W ja 203 bp: DMRT1).

KIRJANDUS

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T. ja Ito, M. (2008), „A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, nr 105, lk 2469–2474.

▼M8

6. liide

VITELLOGENIINI MÕÕTMINE

Vitellogeniini (VTG) mõõdetakse ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodiga, mis töötati algselt välja lepamaimu VTG uurimiseks (Parks *et al.*, 1999). Praegu ei ole *X. laevis'*e analüüsi jaoks müügil antikehasid. Ent arvestades kõnealuse valgu kohta kättesaadavate andmete rohkust ja soodsate kaubanduslike antikehade valmistamise teenuste olemasolu, võib eeldada, et laboritel on lihtne välja töötada ELISA metoodika kõnealuse näitaja mõõtmiseks (Olmstead *et al.*, 2009). Olmstead *et al.* (2009) kirjeldavad ka analüüsimeetodit, mida on kohandatud *X. tropicalis'*e jaoks, nagu allpool näidatud. Meetodi kohaselt kasutatakse *X. tropicalis'*e VTG vastast antikeha, kuid teadaolevalt toimib see ka *X. laevis'*e VTG puhul. Kasutada võib ka mittekonkurentseid ELISA meetodeid, mille puhul alumine avastamispiir võib olla madalam kui allpool kirjeldatud meetodiga.

Materjalid ja reaktiivid

— Eeladsorbeertud 1. antikeha seerum

— Segada üks osa *X. tropicalis'*e VTG 1. antikeha seerumit kahe osa kontrollisase plasmaga ja jätta u 75 minutiks toatemperatuurile, panna 30 minutiks jääle, tsentrifuugida 4°C juures ühe tunni jooksul kiirendusega > 20K × G, eemaldada supernatant, võtta alikvoot, hoida temperatuuril –20°C.

— 2. antikeha

— Kitse anti-küüliku IgG-HRP konjugaat (nt Bio-Rad 172-1019)

— VTG etalon

— Puhastatud *X. laevis'*e VTG kontsentratsiooniga 3,3 mg/ml

— TMB (3,3',5,5'-tetrametüülbensidiin) (nt KPL 50-76-00 või Sigma T0440)

— Kitse normaalseerum (NGS)(nt Chemicon® S26 – 100 ml)

— 96 süvendiga ensüümimmuunanalüüsiks kasutatavad polüstüreenist mikrotiiterplaadid (nt ICN 76-381-04, Costar 53590, Fisher 07-200-35)

— 37°C hübridisatsiooniahi (või kiiresti tasakaalustuv õhuinkubaator) plaatidele, vesivann katseklaasidele

— Muud tavapärased laboriseadmed, kemikaalid ja materjalid

Koostised

Kattepuhver (50 mM karbonaatpuhver, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
vesi	428 ml

10X fosfaatpuhvri lisandiga soolalahus (PBS) (0,1 M fosfaati, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
vesi	810 ml

▼M8

Pesupuhver (PBST):

10X PBS	100 ml
vesi	900 ml

1 M HCl abil reguleerida pH väärtusele 7,3, seejärel lisada 0,5 ml Tween-20

Analüüsipuhver:

Kitse normaalseerum (NGS)	3,75 ml
Pesupuhver	146,25 ml

Proovide võtmine

Vereproov võetakse hepariniseeritud mikrohematokriti katseklaasiga ja asetatakse jääle. Pärast 3 minuti vältel tsentrifuugimist tehakse katseklaasile täke, see murtakse lahti ja plasma valatakse 0,6 ml mikrotsentrifuugianumatesse, mis sisaldavad 0,13 ühikut lüofiilitud aprotiniini. (Need anumad valmistatakse juba varem ette: neisse lisatakse vajalik kogus aprotiniini, mis külmutatakse ja lüofiilitakse vaakumkuivatis madalal kuumusel kuivamiseni.) Plasmat hoitakse kuni analüüsi tegemiseni temperatuuril –80°C.

Plaadi puhul kasutatav metoodika

Plaadi katmine

Segada 20 µl puhastatud VTGd 22 ml karbonaatpuhvriga (lõppkontsentratsioon 3 µg/ml). Lisada 200 µl 96 süvendiga plaadi igasse süvendisse. Katta plaat kleepuva kattekilega ja panna 37°C juures 2 tunniks (või 4°C juuresööks) inkubeerima.

Plaadi blokeerimine

Blokeerimislahuse valmistamiseks lisatakse 38 ml karbonaatpuhvrile 2 ml kitse normaalseerumit (NGS). Eemaldada kattelahus ja raputada kuivaks. Lisada igasse süvendisse 350 µl blokeerimislahust. Katta kleepuva kattekilega ja panna 37°C juures 2 tunniks (või 4°C juuresööks) inkubeerima.

Standardlahuste valmistamine

5,8 µl puhastatud VTG etalonainet segatakse borosilikaadist ühekordses 12 × 75 mm katseklaasis 1,5 ml analüüsipuhvriga. Nii saadakse kontsentratsioon 12 760 ng/ml. Seejärel tehakse lahjenduste seeria: selleks lisatakse iga kord 750 µl eelmise kontsentratsiooniga lahust 750 µl analüüsipuhvrile, et saada lõppkontsentratsioonid 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 ja 50 ng/ml.

Proovide ettevalmistamine

Alustuseks võtta plasmat, mis on analüüsipuhvris lahustatud vahekorras 1: 300 (1 µl plasmat segatud 299 µl analüüsipuhvriga) või 1: 30. Kui oletatakse, et VTG sisaldus on suur, võib kasutada täiendavaid või suuremaid lahjendusi. B/B_o tuleks püüda hoida etalonainete vahemikus. Kui proovide eeldatav VTG sisaldus ei ole märkimisväärne, näiteks kontrollrühma (suguküpsemata) emaste ja isaste puhul, kasutatakse lahjendusvahekorda 1: 30. Sellest väiksema lahjendusega proovidel võivad ilmneda ebasoovitavad maatriksefektid.

Lisaks soovitatakse igal plaadil analüüsida positiivset kontrollproovi. Selleks kasutatakse kõrge indutseeritud VTG sisaldusega plasmat. Plasma lahjendatakse algselt kitse normaalseerumis, jagatakse alikvootideks ja säilitatakse –80°C juures. Iga plaadi jaoks sulatatakse üks alikvoot, mida lahjendatakse täiendavalt analüüsipuhvris ja mida töödeldakse samuti nagu uuritavat proovi.

▼**M8**

1. antikehaga inkubeerimine

Esimese antikeha ettevalmistamiseks tehakse eeladsorbeeritud 1. antikeha seerumist analüüsipuhvris lahjendus vahekorras 1: 2000 (nt 8 µl seerumit 16 ml analüüsipuhvri kohta). Segada 300 µl 1. antikeha lahust katseklaasis 300 µl proovi/standardlahusega. Sarnaselt valmistatakse 300 µl analüüsipuhvri ja 300 µl antikehalahusega ette katseklaas B_o. Lisaks tuleks ette valmistada mittespetsiifilise sideme (NSB) katseklaas, kuhu lisatakse üksnes 600 µl analüüsipuhvrit (ilma antikehadeta). Katseklaasid kaetakse Parafilm-kilega ja keerutatakse ettevaatlikult nende sisu segamiseks. Inkubeerida tund aega 37°C veevannis.

Plaadi pesemine

Plaati tuleb pesta vahetult enne 1. antikehaga inkubeerimise lõppu. Selleks raputatakse plaat tühjaks ja patsutatakse kuivatuspaberiga kuivaks. Seejärel täidetakse süvendid 350 µl pesulahusega, valatakse tühjaks ja patsutatakse kuivaks. Selleks on hea kasutada mitme kanaliga pipetti või plaadipesurit. Pesemist korratakse veel kaks korda nii, et kokku tehakse kolm pesu.

Plaadi täitmine

Pärast plaadi pesemist eemaldada katseklaasid veevannist ja keerutada neid õrnalt. Lisada igast proovist, standardlahusest ning B_o- ja NSB-klaasist 200 µl plaadi kahte süvendisse. Katta plaat kleepuva kattekilega ja panna 37°C juures üheks tunniks inkubeerima.

2. antikehaga inkubeerimine

Eelmise etapi inkubatsiooniosa lõpus tuleks plaati taas kolm korda pesta nagu enne. 2. antikehaga lahjenduse valmistamiseks segatakse 2,5 µl 2. antikeha seerumit 50 ml analüüsipuhvriga. Lisada igasse süvendisse 200 µl 2. antikeha lahjendust, katta kinni, nagu eespool kirjeldatud, ja inkubeerida 37°C juures üks tund.

Substraadi lisamine

Pärast 2. antikehaga inkubeerimist tuleb plaati kolm korda pesta, nagu eespool kirjeldatud. Seejärel lisada igasse süvendisse 100 µl TMB substraati. Lasta reaktsioonil 10 minutit toimuda, eelistatavalt nii, et plaat ei ole ereda valguse käes. Reaktsiooni peatamiseks lisada 100 µl 1 M fosforhapet. Seepeale muutub vedeliku värv sinisest erekollaseks. Mõõta plaadilugeriga neelduvus lainepikkusel 450 nm.

Suhtarvu B/B_0 arvutamine

Kõikidest mõõtmistulemustest lahutatakse NSB keskväärtus. Iga proovi ja standardlahuse B/B_0 arvutamiseks jagatakse neelduvuse väärtus (B) proovi keskmise neelduvusega B_0.

Standardkõvera loomine ja tundmatute koguste kindlakstegemine

Standardkõver luuakse arvutitarkvaraga (nt Slidewrite™ või Sigma Plot®), mis ekstrapoleerib standardlahuste B/B_0 väärtusi kasutades proovi B/B_0 põhjal uuritava valgu koguse. Tavaliselt märgitakse logaritmilisel skaalal esitatud kogus graafikul sigmoidikujulise kõverana. Ent kitsa standardlahuste vahemiku kasutamise korral võib see olla ka lineaarne. Proovi koguseid korrigeeritakse lahjendusteguri arvessevõtmiseks ning tulemused esitatakse VTG sisaldusena milligrammides plasma milliliitri kohta.

Alumise avastamispiiri määramine

Sageli, eriti normaalsete isaste puhul, ei ole selge, kuidas esitada väga väikeste väärtustega tulemusi. Sel juhul tuleks 95 % usalduspiiri kasutades otsustada, kas märkida väärtuse kohta protokolli null või mõni muu number. Kui proovi tulemus jääb nullkontsentratsiooniga standardlahuse (B_0) usaldusvahemikku,

▼M8

tuleks tulemuseks märkida null. Alumine avastamispiir on kõige väiksem standardlahuse kontsentratsioon, mis erineb püsivalt nullkontsentratsiooniga standardlahusest ehk väärtus, mille puhul kaks usaldusvahemikku ei kattu. Prooviga saadud tulemuse korral, mis jääb alumise avastamispiiri usaldusvahemikku või on sellest suurem, märgitakse arvutatud väärtus. Kui prooviga saadud tulemus jääb nullkontsentratsiooniga standardlahuse ja alumise avastamispiiri usaldusvahemiku vahele, tuleks vastava proovi tulemuseks märkida pool alumise avastamispiiri väärtusest.

KIRJANDUS

Olmstead, A.W., Korte, J.J., Woodis, K.K., Bennett, B.A., Ostazeski, S. ja Degitz, S.J. (2009), „Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*“, *General and Comparative Endocrinology*, nr 160, lk 117–123.

Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A. ja Sullivan, C.V. (1999), „Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds“, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, nr 123, lk 113–125.

▼**M8**

7. liide

STATISTILINE ANALÜÜS

LAGDAga saadakse kolme liiki andmeid, mida tuleb statistiliselt analüüsida: 1) kvantitatiivsed pidevandmed, 2) arengu kiirust näitavad sündmuseni kulunud aja andmed (aeg NFi järgi 62. staadiumini) ning 3) järjestusandmed, mis esitatakse histopatoloogilise analüüsi põhjal raskusastme või arengustaadiumi kujul. Joonisel 1 on esitatud soovitatav otsustusskeem statistilise analüüsimeetodi leidmiseks. Lisaks on allpool esitatud mõned kommentaarid, mis võivad olla vajalikud LAGDAga kogutud mõõtmisandmete statistilise analüüsi tegemiseks. Analüüsimeetodite otsustusskeemi järgi tuleb suremuse, kasvu (kehamass ja pikkus) ja maksa somaatilise indeksi (LSI) mõõtmistulemusi analüüsida vastavalt harule „Muud lõppnäitajad“.

Pidevandmed

Pidevate näitajate andmete puhul tuleks kõigepealt kontrollida nende monotoonsust. Selleks tehakse andmetega dispersioonanalüüsi mudeli jaoks sobiv astakteisendus ning võrreldakse lineaar- ja ruutkontraste. Kui andmed on monotoonsed, tuleks paralleelproovide mediaanväärtuste suhtes rakendada sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere-Terpstra trenditesti ilma edasiste analüüsideta. Teine variant, mida saab kasutada normaaljaotuse ja homogeense dispersiooniga andmete puhul, on sammuviisilise elimineerimisega Williamsi test. Kui andmed ei ole monotoonsed (ruutkontrast on oluline ja lineaarkontrast ei ole), tuleks neid analüüsida segamõjuga dispersioonanalüüsi mudeli abil. Seejärel tuleks hinnata andmete normaaljaotust (eelistatavalt Shapiro-Wilki või Anderson-Darlingi testiga) ja dispersiooni homogeensust (eelistatavalt Levene'i testiga). Mõlemad testid tehakse segamõjuga dispersioonanalüüsi mudeli jääkidega. Normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse formaalsete testide asemel võib kasutada ka eksperthinnangut, kuid formaalseid teste tuleb eelistada. Kui andmed on normaaljaotuse ja homogeense dispersiooniga, siis on segamõjuga dispersioonanalüüsi eeldused täidetud ja kontsentratsiooni oluline toime tehakse kindlaks Dunnetti testiga. Mittenormaaljaotuse või heterogeense dispersiooni korral Dunnetti testi eeldused ei kehti ning vaja on leida normaliseeriv ja dispersiooni ühtlustav teisendus. Kui selline teisendus leitakse, tehakse kontsentratsiooni oluline toime kindlaks Dunni testiga. Võimaluse korral tuleks eelistada ühepoolset testi kahepoolsele, aga seda, kumb neist on konkreetse näitaja puhul asjakohane, tuleks otsustada eksperdihinnangu põhjal.

Suremus

Suremuse andmeid tuleks analüüsida kogu katset hõlmava ajavahemiku ulatuses ning need tuleks esitada konkreetses nõus surnud isendite protsendina. Ettenähtud aja jooksul moonet mitteläbinud kulleste, kulleste osaprooviks välja võetud kulleste, väljapraagitud noorkonnade ja katse läbiviija vea tagajärjel surnud loomade andmed tuleks analüüsist välja jätta ning mitte lisada neid protsendimäära arvutamise valemi nimetajasse. Enne mis tahes statistilist analüüsi tuleks suremuse protsendi andmetega teha arkussiinus-ruutjuurteisendus. Teine variant on kasutada astmelise elimineerimisega Cochran-Armitage'i testi, mida võidakse üledispersiooni korral täiendada Rao-Scotti kohandusega.

Kehamass ja pikkus (kasvuandmed)

Isaste ja emaste sootunnused ei ole moonde ajal eristatavad ja seetõttu tuleks kulleste osaproovis mõõdetud kasvuandmeid analüüsida soost sõltumatult. Seevastu noorkonnade kasvuandmeid tuleks analüüsida geneetiliste sugude lõikes. Kõnealuste näitajate puhul võib vajalik olla logaritmteisendus, sest suuruseandmetes esineb sageli logaritmilist normaaljaotust.

▼M8

Maksa somaatiline indeks (LSI)

Maksa massi käsitlevate andmete normaliseerimiseks tuleks need esitada osakaaluna kehamassist (st LSI kujul) ja neid tuleks analüüsida eraldi geneetiliste sugude lõikes.

NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg

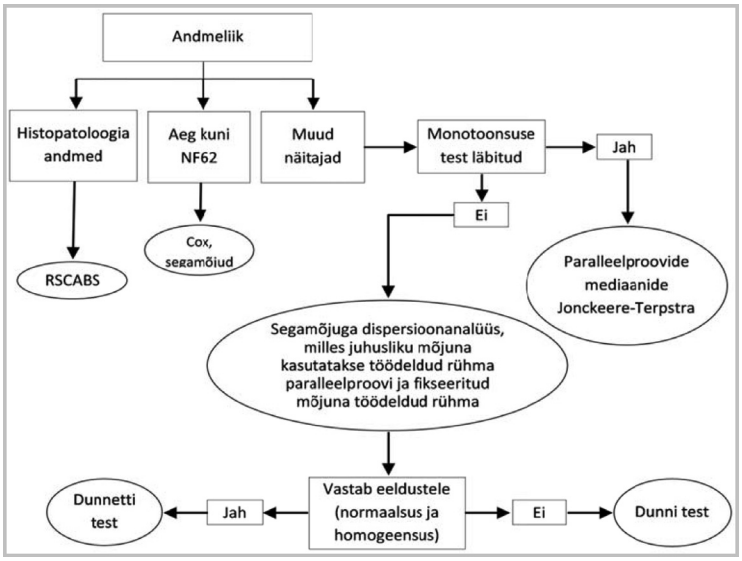
Moondeni kulunud aeg tuleks liigitada sündmuse toimumiseni kulunud aja andmete kategooriasse, kus surmajuhte ja 70 päeva jooksul NFi järgi 62. staadiumisse mittejõudnud isendite andmeid käsitatakse paremalt tsenseeritud andmetena (st tegelik väärtus on suurem kui 70 päeva, aga uuring lõppes enne, kui loomad jõudsid NFi järgi 62. staadiumisse). Katse lõpetamise päeva kindlaksmääramise aluseks tuleks võtta lahjendusveega kontrollrühmades NFi järgi 62. staadiumi (moonde) läbimiseni kulunud mediaanaeg. Moonde lõpetamiseni kulunud mediaanaeg tuleks kindlaks teha Kaplan-Meieri hinnangufunktsioonidega ajapiiri määramiseks. Kõnealust näitajat tuleks analüüsida segamõjudega proportsionaalseid ohte käsitleva Coxi mudeli abil, milles võetakse arvesse uuringu paralleelproovide struktuuri.

Histopatoloogilised andmed (raskusastmed ja arengustaadiumid)

Histopatoloogilised andmed esitatakse raskusastmete või arengustaadiumite kujul. Testis RSCABS (Rao-Scotti kohandusega Cochrane-Armitage'i lõiktest) kasutatakse iga histopatoloogilise raskusastme suhtes Rao-Scotti kohandusega astmelise elimineerimise Cochran-Armitage'i trenditesti (Green *et al.*, 2014). Rao-Scotti kohandus võimaldab testis arvesse võtta katses rakendatud paralleelnõude kasutamise kava. Nn lõiktesti metoodikas on arvesse võetud bioloogilist eeldust, et kemikaali kontsentratsioonide suurenedes kasvab ka raskusaste, säilitades samal ajal subjektide individuaalsed skoorid ja tuues välja tuvastatud toimete tugevuse. Lisaks sellele, et RSCABSi metoodika võimaldab kindlaks teha, millised töödeldud rühmad erinevad statistiliselt kontrollrühmadest (st neis esinevad patoloogiad on raskekujulisemad kui kontrollrühmades), aitab see ka välja selgitada, millise raskusastme juures erinevus tekib, andes seeläbi analüüsi jaoks hädavajalikku taustteavet. Sugunäärmete ja sugujuhade arenguga seotud andmeid on vaja täiendavalt töödelda, kuna RSCABSi aluseks on eeldus, et toime tugevus kasvab koos annusega. Kõnealusel juhul avaldub toime tavalisest aeglasemas või kiiremas arengus. Seetõttu tuleks arenguga seotud andmeid esmalt analüüsida esitatud kujul, et tuvastada kiirenenud arengut, ning seejärel enne teist analüüsi manuaalselt ümber pöörata, et tuvastada arengu mahajäämusi.

Joonis 1

LAGDAga kogutud andmete statistilise analüüsi otsustusskeem.



▼**M8**

KIRJANDUS

Green, J.W., Springer, T.A., Saulnier, A.N. ja Swintek, J. (2014), „Statistical analysis of histopathology endpoints“, *Environmental Toxicology and Chemistry*, nr 33, lk 1 108–1 116.

▼**M8**

8. liide

SKOLIOOSI JÄLGIMISE JA SELLE ESINEMISE VÄHENDAMISEGA SEOTUD KAALUTLUSED

Idiopaatiline skolioos, mis avaldub *Xenopus laevis'*e kullestel tavaliselt kõverdunud saba kujul, võib raskendada uuritavate populatsioonide morfoloogia ja käitumise vaatlemist. Nii katseorganismide kasvatamise ajal kui ka katse tingimustes tuleb püüda skolioosi esinemist vähendada või see välistada. Lõplikus katses ei tohiks mõõduka ja raske skolioosi levimus soovitatavalt ületada 10 %, kuna see tagab suurema kindluse, et katsega on võimalik tuvastada just kemikaalist tingitud toimet muidu tervete kulleste arengule.

Lõpliku katse ajal tehtavate igapäevaste vaatluste käigus tuleks registreerida nii avastatud skolioosijuhtude arv kui ka raskusaste. Väärarengu kirjelduses tuleks märkida selle asukoht (nt pärakuavast ees- või tagapool) ja kõverdumise suund (nt külgmine või selja poolt kõhu poole). Raskusastmeid võib liigitada järgmiselt:

NR – ebaoluline: kõverdumist ei esine;

1) – kerge: väike külgmine kõverdumine pärakuavast tagapool; nähtav üksnes puhkeolekus;

2) – mõõdukas: külgmine kõverdumine pärakuavast tagapool; nähtav kogu aeg, aga ei takista liikumist;

3) – raske: külgmine kõverdumine pärakuavast eespool VÕI liikumist takistav mis tahes kõverdumine VÕI mis tahes kõverdumine selja poolt kõhu poole.

USA Keskkonnakaitseameti juures tegutsev insektitsiidide, fungitsiide ja rodentitsiide käsitlev teadusnõukogu (FIFRA SAP 2013) on läbi vaadanud *X. laevis'*ega (NFi järgi 51. kuni 60. või kõrgemas staadiumis) tehtud viieteistkümne kahepaiksete moonde katse koondandmed skolioosi kohta ning on esitanud üldised soovitused selle kõrvalekalde levimuse vähendamiseks uuritavates populatsioonides. Need soovitused on asjakohased ka LAGDA puhul, kuigi see katse hõlmab pikemat arenguperioodi.

Varasemad kudemisnäitajad

Üldjuhul tuleks sigimispaarid moodustada kvaliteetsetest tervetest täiskasvanud isenditest. Skolioosiga järglasi andvate sigimispaaride kõrvaldamine võib aja jooksul selle esinemissagedust vähendada. Konkreetsemalt võib kasu olla sellest, kui kasutatakse vähem loodusest püütud sigimisloomi. LAGDA kokkupuuteperiood algab siis, kui embrüod on NFi järgi 8.–10. arengustaadiumis, ning katse alguses ei ole praktiliselt võimalik kindlaks teha, kas konkreetsetel isenditel tekib skolioos. Seega tuleks lisaks skolioosi varasema esinemise kontrollimisele katsesse kaasatud loomade seas dokumenteerida ka kurnade haiguslood (sh skolioosi levimus nende kulleste seas, kellel lastakse areneda). Kasu võib olla ka sellest, kui jälgida uuringus kasutamata jäänud kurnaosa edasist arengut ja nende vaatluste tulemused teatavaks teha (FIFRA SAP 2013).

Vee kvaliteet

Oluline on tagada piisavalt hea vee kvaliteet nii labori kasvukeskkonnas kui ka katse ajal. Lisaks veeorganismidele mõjuva mürgisuse katsete jaoks tavapäraselt kontrollitavatele veekvaliteedi näitajatele võib olla kasulik jälgida ja korrigeerida ka võimalikke toiteainete puudujääke (nt C-vitamiini-, kaltsiumi- või fosforivaegus) või liigne seleeni- ja vasesisaldus, mille puhul on täheldatud skolioosi põhjustavat mitmesuguse tugevusega toimet laboris kasvatatud *Rana* ja *Xenopus'*e liikidele (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; andmed publikatsioonist FIFRA SAP 2013). Üldiselt saab vee kvaliteeti ja katsealuste liikide tervist parandada sobiva söötmisrežiimi valimise (vt 4. liide) ja nõu regulaarse puhastamisega.

▼M8

Söötmine

Konkreetsed soovitused LAGDA puhul edukaks osutunud söötmisrežiimi kohta on esitatud 4. liites. Soovitatavalt tuleks kasutatavat sööta kontrollida bioloogiliste mürkainete, herbitsiidide ja muude *X. laevis'*el või teistel veeloomadel skolioosi põhjustavate pestitsiidide suhtes (Schlenk ja Jenkins 2013). Näiteks on leitud seos mõnede koliinesteraasi inhibiitorite ja skolioosi vahel nii kaladel (Schultz *et al.* 1985) kui ka konnadel (Bacchetta *et al.* 2008).

KIRJANDUS

Bacchetta, R., Mantecca, P., Andrioletti, M., Vismara, C. ja Vailati, G. (2008), „Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos", *Science of the Total Environment*, nr 392, lk 110–118.

Schultz, T.W., Dumont, J.N. ja Epler, R.G. (1985), The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide", *Toxicology*, nr 36, lk 185–198.

Leibovitz, H.E., Culley, D.D. ja Geaghan, J.P. (1982), „Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels", *Journal of the World Aquaculture Society*, nr 13, lk 322–328.

Marshall, G.A., Amborski, R.L. ja Culley, D.D. (1980), „Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae", *Journal of the World Aquaculture Society*, nr 11, lk 445–453.

Martinez, I., Alvarez, R., Herraez, I. ja Herraez, P. (1992), „Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles", *Anatomical Records*, nr 233(2), lk 314–320.

Schlenk, D. ja Jenkins, F. (2013), „Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance", *US EPA FIFRA SAP Minutes*, nr 2013-03. 21.–23. mai 2013. Washington, DC.